



Doctorado en Neurociencia UAM

Estudio de la hiperfosforilación de la proteína tau y su efecto sobre la morfología neuronal en el hámster sirio durante la hibernación

TESIS DOCTORAL

Autora: Mamen Regalado Reyes, Graduada en Biotecnología

Director: Gonzalo León Espinosa

Co-director: Javier DeFelipe Oroquieta

Afiliación: Laboratorio Cajal de Circuitos Corticales, CTB-UPM

Madrid, 18 de Enero de 2021



INTERNATIONAL
CAMPUS OF
EXCELLENCE



Javier Defelipe Oroquieta, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

y

Gonzalo León Espinosa, profesor adjunto de la Universidad San Pablo CEU,

HACEN CONSTAR:

Que Dña. M^a Carmen Regalado Reyes ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos correspondientes a la Tesis Doctoral titulada “Estudio de la hiperfosforilación de la proteína tau y su efecto sobre la morfología neuronal”.

Consideramos que dichos trabajos han sido ejecutados satisfactoriamente y, una vez revisados, manifestamos nuestra conformidad con la presentación de esta tesis doctoral para ser juzgada.

Para que conste y surta los efectos oportunos, lo firmamos en Madrid a 18 de Enero de 2021

Fdo: Dr. Javier Defelipe Oroquieta

Fdo: Dr. Gonzalo León Espinosa

No hay viento favorable para el que no sabe a dónde va.

- Séneca

Fuentes de financiación

Los procedimientos experimentales llevados a cabo en la presente tesis doctoral se han financiado gracias a los siguientes proyectos de investigación:

- Beca del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (SAF 2015-66603-P).
- Proyecto Cajal Blue Brain (BFU 2016—77885-P).
- Centro de Investigación en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED, CB06/05/0066).
- Asociación de Alzheimer (ZEN-15-321663).
- Proyecto Horizonte 2020 de la Unión Europea (beca 785907; SGA Human Brain Project)

Comités de ética

Los procedimientos experimentales con el hámster sirio fueron llevados a cabo en el animalario del Instituto Cajal, CSIC (Madrid), cuyo número de registro es ES 28079 0000184 y en el animalario de la Universidad San Pablo CEU (Madrid), con número de registro ES 28022 0000015, siendo todos ellos fueron aprobados por el comité de ética de experimentación animal correspondiente (PROEX 292/15 y PROEX 74/14 respectivamente).

Con respecto al manejo de muestras humanas, el informe de evaluación bioética del comité de ética del CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) fue favorable (código interno: 212-2018).

Agradecimientos

Hay tanto por agradecer que no sé muy bien por dónde empezar. Creo que tengo que remontarme a una de mis profesoras de biología del colegio. Gracias Carolina, por aquel día en el que me explicaste las bases de la genética y conseguiste encender esa llama de científica en mi interior.

A mis profesores del Grado en Biotecnología en la Universidad Francisco de Vitoria por transmitirme valores y principios y por participar en la construcción de los cimientos de mi vida. Gracias a todos y, en especial, a Maite, por haber estado tan cerca de mí durante toda la carrera y a Cruz, por haber confiado en mí antes incluso que yo misma.

A Sourav Ghosh, mi tutor de prácticas en la Universidad de Yale, por haber sabido potenciar mi interés e inquietud por aprender y continuar formándome de manera indefinida. Si este documento está hoy escrito es, principalmente, gracias a todo lo que me enseñó durante mi estancia en su laboratorio.

Gracias también a todos mis compañeros del Laboratorio Cajal de Circuitos Corticales y, en especial a mis directores de Tesis. Gracias Gonzalo, por haberme acompañado durante estos años, comenzando ya con mi Trabajo Fin de Master. Gracias por tratar siempre de enseñarme y ayudarme y por haber compartido conmigo tus ganas y tu pasión por la ciencia y la investigación. Gracias Javier, por haberme abierto las puertas a tu laboratorio y por haberme dado la oportunidad de aprender, formarme y desarrollar esta tesis rodeada de personas maravillosas.

A Ruth y Asta, las “inyectólogas”, gracias por haber compartido conmigo vuestra sabiduría y por haberme aceptado en vuestro equipo como una más. Gracias por vuestra paciencia y por todas las horas que hemos pasado en las tinieblas escuchando Qué Radio con papel albal a modo de antena.

A Miri, Lore y Diana que durante estos años han sido mucho más que compañeras de trabajo. Gracias por todos los momentos, las risas y los cotilleos entre bastidores que hacían de cada día en el laboratorio algo divertido y dinámico.

A Sandra, por haberme dado la oportunidad de entrar en su vida ya desde el primer día y por haber hecho que ir cada día a trabajar al CTB fuese una aventura

nueva. Por haber compartido conmigo esos desayunos en la salita y ese sufrimiento cuando Imaris se queda colgado que pocas personas realmente conocen. Gracias por haber estado siempre ahí durante estos años.

Gracias Isa, por haberme enseñado las herramientas necesarias para sacar esta tesis adelante. Pero, sobre todo, gracias por enseñarme y motivarme a tener una actitud positiva ante la vida. Gracias por compartir tu sonrisa conmigo cada día durante estos años y gracias por tu eterna paciencia y por estar siempre ahí, disponible para todos.

Gracias a mis padres, Antonio y Mamen y a mis hermanas, Cristina y María, por apoyarme siempre en mis decisiones y por acompañarme, sea cual sea el camino que escoja. Porque a pesar de no saber lo que era la biotecnología el día que les dije que quería estudiarlo, me dijeron que adelante y porque siempre me han dado alas para poder llegar a donde yo quiera.

Gracias a mi segunda familia, Pedro, Pilar y Ron, por quererme y aceptarme tal y como soy y por haberme acompañado y compartido mi carrera científica.

Gracias a mis biotecs, especialmente a Carola, Marcia, Helen, Teru, Rubén y María, por preocuparos por mí y por formar una parte fundamental en mi vida. Gracias también a mi amigo, Gon, por estar ahí siempre a tu manera y por entenderme tan bien.

Gracias a mi familia, primos, tíos y a mis abuelos porque cada uno de vosotros ha contribuido, a su manera, a hacer de mí lo que soy.

Y, por último, gracias, Nico. Gracias por ser mi compañero de viaje, de experiencias, y de vida. Gracias por haber aguantado estoicamente mis charlas sobre neurociencia, sobre el cerebro, tau y todas esas palabrejas que, realmente, te deben sonar a chino. Gracias por preocuparte por mis intereses y por ayudarme a sacar la mejor versión que llevo dentro. Gracias por empujarme a seguir y a avanzar en esos momentos en los que flojeaba. Gracias por ser y por estar.

En definitiva, a todos aquellos que, aunque brevemente, habéis aparecido en mi vida y habéis puesto vuestro granito de arena para que esto salga adelante, gracias.

Resumen

La morfología neuronal es crucial para su correcto funcionamiento y las alteraciones en la misma se han descrito en numerosas patologías. Tanto la morfología de los árboles dendríticos como la distribución, número y densidad de las espinas dendríticas son específicas en cada región cerebral, en cada tipo neuronal e incluso en cada neurona de forma individual. En determinadas patologías en las que tiene lugar la pérdida de función neuronal asociada a alteraciones morfológicas, como la Enfermedad de Alzheimer (EA), se han descrito una serie de cambios a nivel molecular, entre los que cabe destacar la hiperfosforilación de la proteína tau —modificación postraducciona presente en un gran número de patologías englobadas bajo el nombre de taupatías—. Los estadios más avanzados de la EA se asocian con mayores niveles de proteína tau hiperfosforilada. Sin embargo, si la proteína tau alterada es responsable de las alteraciones a nivel morfológico de las neuronas es una cuestión aún sin resolver. Por otro lado, existen procesos naturales en los que tiene lugar una hiperfosforilación fisiológica, reversible y no patológica de la proteína tau en neuronas, como es la hibernación de algunos mamíferos. Así, la presente tesis se centra en el estudio del efecto de la hiperfosforilación de la proteína tau sobre la morfología neuronal en la corteza cerebral del hámster sirio en la hibernación, encontrando cambios en la morfología de las células piramidales asociados a la presencia de proteína tau hiperfosforilada. Además, para entender mejor las alteraciones de la proteína tau en la EA, se han analizado los patrones de localización y expresión de la proteína tau hiperfosforilada en tejido cerebral de pacientes con EA en distintos estadios de la patología.

Abstract

The morphology of neurons is crucial for their correct functioning, and morphological alterations have been described in several pathologies. Both dendritic tree morphology and dendritic spine number and distribution are specific of every brain region, every brain area and even every individual neuron. In several pathologies in which neuronal function is lost in association with neuronal morphology alterations such as Alzheimer's Disease (AD), diverse molecular alterations have been described, such as tau protein hyperphosphorylation —post translational modification present in a large number of pathologies referred to as tauopathies—. In AD, later stages of the pathology have been associated with higher levels of tau hyperphosphorylation. However, whether hyperphosphorylated tau is responsible for morphological alterations is still unknown. Moreover, some natural situations such as mammalian hibernation exhibit a physiological and reversible tau protein hyperphosphorylation. During this process, tau is hyperphosphorylated in a similar way as it is in AD but resulting innocuous for the hibernating animal and reverting upon arousal. Thereby, the present doctoral thesis is focused on the study of morphological alterations associated to the presence of hyperphosphorylated tau in the Syrian hamster's cerebral cortex during hibernation, finding morphological changes in pyramidal neurons that appear together with tau hyperphosphorylation. Moreover, with the aim of better understanding the alterations of tau protein during the development of AD, the patterns of localization and expression of hyperphosphorylated tau in cortical samples of AD patients in different stages of the pathology were analyzed.

Lista de abreviaturas y nomenclatura

A β : amiloide- β ; del inglés *amyloid- β* .

AT8+: células, dendritas o grupos de estudio en los que el marcaje con el anticuerpo AT8 es positivo.

AT8-: células, dendritas o grupos de estudio en los que el marcaje con el anticuerpo AT8 es negativo.

AD: del inglés *Alzheimers Disease*.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ARN: ácido ribonucleico.

C: grupo control.

CBD: degeneración corticobasal; del inglés *corticobasal degeneration*.

CaMKII: calcio-calmodulina quinasa II; del inglés *calcium calmodulin kinase II*.

cdk5: quinasa dependiente de ciclina 5; del inglés *cyclin-dependent kinase 5*.

CERAD: consorcio para el establecimiento de un registro para la Enfermedad de Alzheimer; del inglés *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*

CIBERNED: Centro de Investigación en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas.

CSIC: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

DAB: 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorido.

DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol.

DCB: degeneración corticobasal.

DCL: demencia por cuerpos de Lewy.

EA: enfermedad de Alzheimer.

EH: esclerosis hipocampal.

GSK3: proteína glucógeno sintasa quinasa 3; del inglés *glycogen synthase kinase 3*.

IDP: proteína intrínsecamente desordenada; del inglés *intrinsically disordered protein*.

LY: amarillo lucifer; del inglés *lucifer yellow*.

MAP: proteína asociada a microtúbulos; del inglés *microtubule associated protein*.

MAPT: proteína asociada a microtúbulos tau; del inglés *microtubule associated protein tau*.

NFT: ovillo neurofibrilar; del inglés *neurofibrillary tangle*.

NT: filamentos de neuropilo; del inglés *neuropil threads*.

PB: tampón fosfato; del inglés *phosphate buffer*.

PBS: tampón fosfato salino; del inglés *phosphate buffer - saline*.

PFA: paraformaldehído.

PHF: filamento helicoidal pareado; del inglés *paired helical filament*.

PIR: infrarrojo pasivo; del inglés *passive infrared*.

PKA: proteína quinasa A; del inglés *protein kinase A*.

PKC: proteína quinasa C; del inglés *protein kinase C*.

PP2A: proteína fosfatasa 2A; del inglés *protein phosphatase 2A*.

PP2B: proteína fosfatasa 2B; del inglés *protein phosphatase 2B*.

PP2C: proteína fosfatasa 2C; del inglés *protein phosphatase 2C*.

Pro: prolina; del inglés *proline*.

PSP: parálisis supranuclear progresiva.

Ser: serina; del inglés *serine*.

SF: filamentos rectos; del inglés *straight filaments*.

Syn: sinucleína; del inglés *synuclein*.

T(AT8+): grupo torpor AT8+.

T(AT8-): grupo torpor AT8-.

TDP43: proteína TAR de unión a DNA 43; del inglés *TAR DNA binding protein 43*.

Thr: treonina; del inglés *threonine*.

Lista de figuras y tablas

Figura 1: Isoformas y estructura de la proteína tau humana en el SNC.

Figura 2: Representación esquemática de los sitios de hiperfosforilación más relevantes de la proteína tau y los anticuerpos específicos que detectan la fosforilación en ellos.

Figura 3: ilustraciones de Alöis Alzheimer, Braak y Del Tédici-Braak en las que se muestran los principales hitos neuropatológicos de la EA.

Figura 4: Representación del avance de la patología de tau según describieron Heiko y Eva Braak en 1991.

Figura 5: representación esquemática de las capas de la corteza cerebral, así como de las neuronas piramidales presentes en cada una de ellas.

Figura 6: ilustración de una sección coronal del hipocampo humano en la que se muestran las áreas de este, así como las neuronas que componen el bucle trisináptico.

Figura 7: representación esquemática de la morfología de una neurona piramidal.

Figura 8: imágenes de microscopía confocal en las que se muestran espinas dendríticas, así como sus reconstrucciones tridimensionales.

Figura 9: imágenes de distintos animales que hibernan.

Figura 10: imágenes del hámster sirio en hibernación en las fases de torpor y arousal.

Figura 11: nevera y software diseñados para permitir y monitorizar la hibernación del hámster sirio.

Figura 12: fotografía del sistema de inyecciones intracelulares.

Figura 13: imagen de microscopía confocal de una neurona piramidal y su reconstrucción tridimensional.

Figura 14: representación esquemática del procedimiento que se ha seguido para acotar el rango de análisis del árbol dendrítico apical.

Figura 15: representación esquemática que ilustra los tipos de segmentos de las dendritas.

Figura 16: imágenes del software Imaris.

Figura 17: fotomicrografías para ilustrar los patrones de marcaje de tau hiperfosforilada con AT8 en el cerebro del hámster sirio.

Figura 18: representación esquemática de las neuronas piramidales inyectadas para los tres grupos de estudio.

Figura 19: fotomicrografías en las que se ilustran neuronas piramidales inyectadas en la corteza cerebral del hámster sirio.

Figura 20: ilustraciones representativas de tres neuronas piramidales de la corteza cerebral del hámster sirio pertenecientes a cada grupo de estudio.

Figura 21: gráficos en los que se muestran las variables que expresan la complejidad neuronal de las dendritas apicales.

Figura 22: gráficos en los que se muestran las variables que expresan la morfología neuronal de las dendritas apicales.

Figura 23: gráfica en la que se muestra la distancia con respecto al soma a la cual emergen las primeras seis dendritas apicales colaterales para cada grupo de estudio.

Figura 24: gráficos en los que se muestran las variables que expresan la complejidad neuronal de las dendritas basales.

Figura 25: gráficos en los que se muestran las variables que expresan la morfología neuronal de las dendritas basales.

Figura 26: gráficos que muestran el análisis morfológico de las dendritas apicales por segmentos.

Figura 27: gráficos que muestran el análisis morfológico de las dendritas basales por segmentos.

Figura 28: gráficos que muestran la densidad de espinas dendríticas en la dendrita apical principal.

Figura 29: gráficos que muestran la longitud de las espinas dendríticas en la dendrita apical principal.

Figura 30: gráficos que muestran el área de las espinas dendríticas en la dendrita apical principal.

Figura 31: gráficos que muestran el volumen de las espinas dendríticas en la dendrita apical principal.

Figura 32: gráficos que muestran la densidad de espinas dendríticas en las dendritas basales.

Figura 33: gráficos que muestran la longitud de las espinas dendríticas en las dendritas basales.

Figura 34: gráficos que muestran el área de las espinas dendríticas en las dendritas basales.

Figura 35: gráficos que muestran el volumen de las espinas dendríticas en las dendritas basales.

Figura 36: gráficos que muestran la densidad de espinas dendríticas en la región distal de las dendritas colaterales apicales de las neuronas del área CA3 del hipocampo del hámster sirio.

Figura 37: ejemplos de proyecciones en z de fotomicrografías adquiridas mediante microscopía confocal en las que se muestran células de microglía del hámster sirio en hibernación.

Figura 38: fotomicrografías representativas del patrón de marcaje de la proteína tau hiperfosforilada que se obtiene mediante el uso de los anticuerpos pS396 y AT100 en el hipocampo humano.

Figura 39: fotomicrografías pertenecientes a pacientes con distinto estadio de Braak en las que se ilustra la morfología, así como los patrones de marcaje de la proteína tau hiperfosforilada detectada mediante los anticuerpos AT100 y pS396.

Figura 40: fotomicrografías representativas mostrando los patrones de marcaje de la proteína tau hiperfosforilada detectada mediante los anticuerpos AT100 y pS396 en un paciente con bajo estadio de Braak y otro paciente con elevado estadio de Braak así como sus gráficos correspondientes.

Figura 41: fotomicrografías obtenidas mediante microscopía confocal de la región distal de una dendrita apical AT8+ del hámster sirio en hibernación.

Figura 42: ilustración y fotomicrografías en las que se muestran las microcolumnas corticales.

Figura 43: ilustración esquemática en la que se muestra la progresión de la hiperfosforilación de la proteína tau desde el extremo N-terminal de la proteína hacia el extremo C-terminal.

Tabla 1: información técnica y patológica de los 21 casos humanos empleados en la presente tesis doctoral.

Tabla 2: información detallada sobre los anticuerpos utilizados en la presente tesis doctoral.

Tabla 3: descripción de los tipos de análisis llevados a cabo y las principales variables analizadas con respecto a las reconstrucciones tridimensionales de los árboles dendríticos.

Tabla 4: significación estadística de los resultados mostrados en la figura 21.

Tabla 5: significación estadística de los resultados mostrados en la figura 22.

Tabla 6: significación estadística de los resultados mostrados en la figura 24.

Tabla 7: significación estadística de los resultados mostrados en la figura 25.

Tabla 8: significación estadística de los resultados mostrados en la figura 26.

Tabla 9: significación estadística de los resultados mostrados en la figura 27.

Tabla 10: resumen de los resultados obtenidos con respecto al análisis de morfología neuronal en las dendritas apicales.

Tabla 11: resumen de los resultados obtenidos con respecto al análisis de morfología neuronal en las dendritas basales.

Tabla 12: significación estadística de los resultados mostrados en la figura 28.

Tabla 13: significación estadística de los resultados mostrados en la figura 29.

Tabla 14: significación estadística de los resultados mostrados en la figura 30.

Tabla 15: significación estadística de los resultados mostrados en la figura 31.

Tabla 16: significación estadística de los resultados mostrados en la figura 33.

Tabla 17: significación estadística de los resultados mostrados en la figura 34.

Tabla 18: significación estadística de los resultados mostrados en la figura 35.

Tabla 19: resumen de los resultados obtenidos con respecto al análisis de morfología de las espinas dendríticas de la dendrita apical principal y en las dendritas basales.

Tabla 20: resultados obtenidos en cuanto al número de células positivas para el marcaje AT100 y células positivas para el marcaje pS396, volumen analizado, ratio AT100/pS396, porcentaje de colocalización, número de placas β -amiloide por mm² y presencia o no de inclusiones TDP43 positivas en el citoplasma.

1. Índice

Declaración de los directores	I
Epígrafe	II
Fuentes de financiación	III
Comités de ética	III
Agradecimientos	IV-V
Resumen	VI
Abstract	VII
Lista de abreviaturas	VIII-X
Lista de figuras y tablas	XI-XV

1. ÍNDICE

(págs. 16-19)

2. INTRODUCCIÓN

(págs. 20-50)

2.1. Proteína tau	20
2.1.1. Genética y estructura	20
2.1.2. Funciones	22
2.1.3. Regulación enzimática	23
2.2. Taupatías	25
2.2.1. Enfermedad de Alzheimer	25
2.3. Corteza cerebral y formación del hipocampo	32
2.3.1. Corteza cerebral	33
2.3.2. Formación del hipocampo	35
2.3.3. Células piramidales	37
2.3.3.1. Espinas dendríticas	39
2.3.4. Microglía	43

2.4. Modelos para el estudio de la Enfermedad de Alzheimer	44
2.4.1. Hibernación	45
2.4.1.1. Adaptación cerebral durante la hibernación	47

3. OBJETIVOS

(pág. 51)

4. MATERIALES Y MÉTODOS

(págs. 52-70)

4.1. Material biológico empleado	52
4.1.1. Hámster sirio	52
4.1.2. Humano	55
4.2. Procesamiento del tejido	55
4.2.1. Hámster sirio	55
4.2.2. Humano	55
4.3. Inyecciones intracelulares	57
4.4. Inmunohistoquímica	59
4.4.1. Revelado con DAB	60
4.5. Microscopía confocal	61
4.6. Reconstrucción morfológica	63
4.6.1. Neurolucida	63
4.6.2. Imaris	68
4.7. Análisis estadístico	70
4.8. Estudio metabólico	70

5. RESULTADOS

(págs. 71-119)

5.1. Hámster sirio	71
5.1.1. Patrones de hiperfosforilación de la proteína tau	71

5.1.2. Inyecciones intracelulares	73
5.1.2.1. Hiperfosforilación de tau en las neuronas piramidales inyectadas en la capa Va	73
5.1.2.2. Morfología neuronal e hiperfosforilación de tau	74
5.1.2.3. Resumen de los resultados obtenidos con respecto a la morfología neuronal	93
5.1.2.4. Morfología de las espinas dendríticas e hiperfosforilación de tau	94
5.1.3. Estudio preliminar de la densidad de espinas dendríticas en la región CA3 del hipocampo	107
5.1.4. Efecto de la hibernación en la morfología de la microglía	108
5.1.5. Estudio metabolómico en el hámster sirio en hibernación (colaboración con el laboratorio de la Dra. Coral Barbas)	112
5.2. Humano	111
5.2.1. Estudio de la distribución y colocalización de la proteína tau hiperfosforilada detectada mediante los anticuerpos AT100 y pS396	111

6. DISCUSIÓN

(págs. 120-138)

6.1. La hibernación del hámster sirio como modelo para el estudio de los procesos de fosforilación y desfosforilación de la proteína tau	119
6.1.1. Cambios en la morfología neuronal e hiperfosforilación de tau	125
6.1.2. Morfología y distribución de las espinas dendríticas en relación con la hiperfosforilación de la proteína tau	128
6.1.3. Actividad cerebral y morfología neuronal durante la hibernación del hámster sirio	131

6.1.4. Modificaciones en la microglía durante la hibernación del hámster sirio	132
6.2. Hiperfosforilación de la proteína tau como posible mecanismo neuroprotector	134
6.3. Fosforilación de la proteína tau y formación de ovillos neurofibrilares en la EA	136

7. CONCLUSIONES

(págs. 139-140)

8. BIBLIOGRAFÍA

(págs. 141-153)

9. ANEXO

(textos científicos publicados durante de la presente tesis doctoral)

2. **Introducción**

La presente tesis doctoral se centra en el estudio del efecto de la hiperfosforilación de la proteína tau sobre la morfología neuronal de las células piramidales de la capa V durante la hibernación del hámster sirio. Además, con el objetivo de profundizar en los mecanismos que subyacen a la formación de ovillos neurofibrilares en las taupatías como la Enfermedad de Alzheimer (EA), se ha llevado a cabo un estudio, en muestras de pacientes con EA, de la distribución y colocalización de la proteína tau hiperfosforilada. A continuación, se desarrollan una serie de textos relacionados con los temas de la presente tesis doctoral.

2.1. *Proteína tau*

2.1.1. *Genética y estructura*

La proteína tau, descubierta en 1975 y denominada así por Marc Krischner (Weingarten *et al.*, 1975), pertenece a la familia de proteínas de unión a microtúbulos o MAPs (siglas en inglés de *microtubule associated proteins*). Está altamente conservada y puede encontrarse en diversas especies animales como, por ejemplo, *C. elegans*, *Drosophila melanogaster*, pez cebra, roedores y humanos (Weingarten *et al.*, 1975). Tau se expresa de forma mayoritaria en el sistema nervioso, aunque también se ha encontrado en otros tejidos como riñón, pulmón y testículos (Gu, Oyama and Ihara, 1996). En el cerebro, la proteína tau no se expresa de manera homogénea, sino que su expresión predomina en algunas áreas como la corteza o el globo pálido y es casi inexistente en otras como el cerebelo. En cuanto a las células que la expresan, tau se encuentra principalmente en las neuronas, pero se ha descrito que también está presente a baja concentración en oligodendrocitos (McMillan *et al.*, 2008). Dentro de las neuronas, tau se localiza predominantemente en los axones (Hanger, Anderton and Noble, 2009) pero, bajo ciertas condiciones patológicas como la Enfermedad de Alzheimer (EA) o fisiológicas como la hibernación, esta localización puede variar (Tashiro *et al.*, 1997) (Introducción apartado 1.2. *Taupatías*).

En el cerebro humano pueden sintetizarse hasta seis isoformas distintas de la proteína tau por ajuste alternativo del gen MAPT (siglas en inglés de *microtubule associated protein tau*), que contiene 16 exones y se localiza en el

cromosoma 17q21 (Andreadis, 2006). Las diferentes isoformas se generan por inclusión/eliminación de los exones 2, 3 y 10 y se pueden categorizar en función del número de inserciones en el extremo amino terminal (0N, 1N o 2N) y según el número de dominios repetidos en el extremo carboxi-terminal (3R o 4R) (Figura 1). Estos dominios repetidos son responsables de la unión de tau a los microtúbulos, siendo 4R la isoforma con mayor afinidad y, por lo tanto, la más eficiente promoviendo el ensamblaje de los microtúbulos (Goedert and Jakes, 1990). Por el contrario, las isoformas que no contienen el exón 10, es decir, 3R, presentan una menor afinidad a los microtúbulos, lo que favorece la plasticidad celular. La isoforma más larga de tau en el sistema nervioso central (SNC) contiene 441 residuos (aminoácidos) y, como se ilustra en la Figura 1, en el transcrito primario se incluyen los exones 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12 y 13. Tras la traducción, se obtendrá una proteína con unos 80 residuos fosforilables, es decir, posibles dianas para proteínas quinasas que pueden añadir grupos fosfato a dichos aminoácidos (serinas y treoninas, principalmente) (Avila et al. 2016).

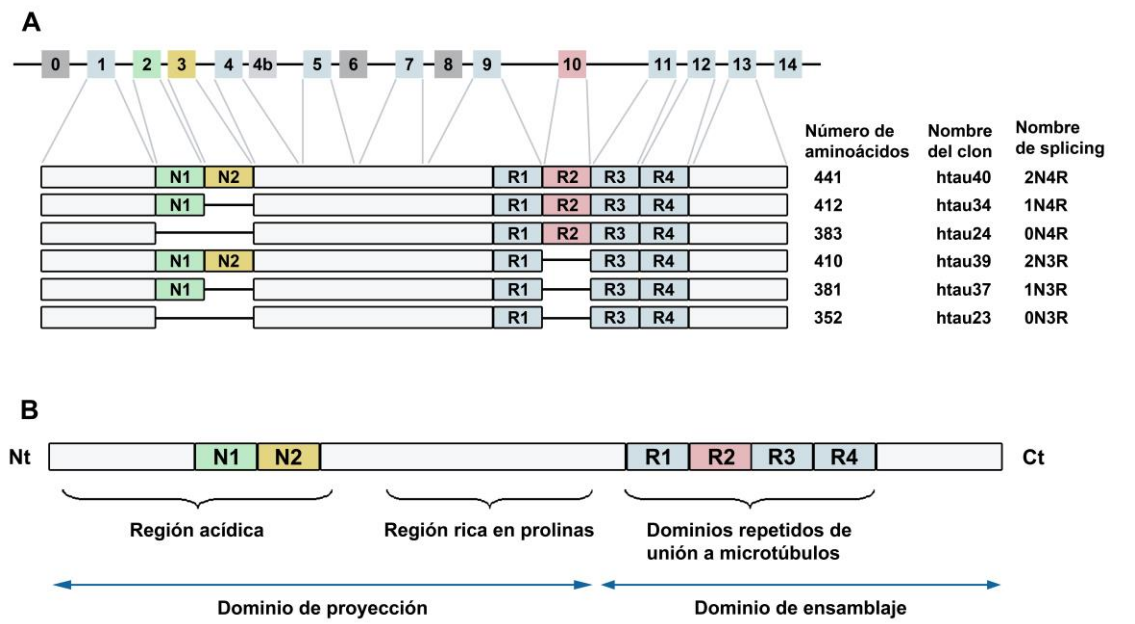


Figura 1| Isoformas y estructura de la proteína tau humana en el SNC. (A) Gen MAPT y las 6 isoformas de la proteína tau en el cerebro humano en función de los exones que se eliminan. (B) Dominios de la isoforma 2N4R de la proteína tau humana. Regiones de la proteína tau desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal: región acídica, región rica en prolina (domino de proyección) y dominios repetidos Ct (dominio de ensamblaje) (modificado de Wang & Mandelkow, 2016).

En relación con su estructura, tau se ha descrito como una proteína intrínsecamente desordenada (IDP del inglés *intrinsically disordered protein*), encontrada sin plegar en forma nativa. Su cadena polipeptídica es altamente flexible y tiene pocas estructuras secundarias. El estudio de la estructura primaria de tau ha revelado que contiene tres dominios principales definidos por su carácter ácido-base o por su interacción con los microtúbulos. Estos dominios son: extremo N-terminal ácido, región rica en prolina, y un extremo C-terminal básico (Figura 1B). Estas tres regiones pueden incluirse dentro de dos grandes dominios: dominio de proyección (extremo N-terminal) y dominio de ensamblaje (región rica en prolina y extremo c-terminal), que cuentan con puntos isoeléctricos que van desde 3,8 en el extremo N-terminal (ácido) a 11,4 y 10,8 en la región rica en prolina y en el extremo C-terminal (básico), pudiendo considerar, pues, a la proteína tau como un dipolo compuesto por dos dominios con cargas opuestas y que son modulables mediante modificaciones post-traduccionales (Avila et al., 2016; Kolarova et al., 2012; Wang & Mandelkow, 2016). El dominio de proyección es el que sobresale de la superficie del microtúbulo cuando tau se encuentra en interacción con él. Este dominio es el encargado de la interacción con otros elementos del citoesqueleto y la membrana plasmática, como la espectrina o los filamentos de actina (Kolarova *et al.*, 2012). Por ejemplo, se considera que es el dominio de proyección el que establece la distancia entre los microtúbulos, pudiendo ser el responsable de cambios en el diámetro axonal. Por otro lado, el dominio de ensamblaje es el encargado de mantener la estabilidad de los microtúbulos mediante su interacción con los mismos (Kolarova *et al.*, 2012). En cuanto a su estructura secundaria, la proteína tau, por ser una IDP, no tiene una estructura secundaria definida. Sin embargo, las modificaciones post-traduccionales a las que está sometida y en las que profundizaremos en próximos apartados, podrían facilitar una "ganancia" de estructuras secundarias, especialmente bajo ciertas condiciones patológicas (Avila et al. 2016).

2.1.2. Funciones

El papel de la proteína tau más ampliamente descrito es la estabilización de los microtúbulos mediante interacción con tubulina, participando en los fenómenos de ensamblaje y desensamblaje de los mismos, y contribuyendo así al

mantenimiento de la forma de la célula (Avila et al. 2016). Además, se ha descrito la participación de tau en el transporte axonal por medio de diversos mecanismos, como por ejemplo afectando al funcionamiento de las proteínas de transporte (Wang and Mandelkow, 2016).

Sin embargo, tau no interacciona únicamente con los microtúbulos, pues se ha descrito también que podría unirse a diversas proteínas actuando en multitud de procesos celulares. Así, más allá de su papel en el axón, tau desempeña un papel importante en la plasticidad sináptica (Avila et al. 2016). Además, se ha encontrado tau en el núcleo de células neuronales y no neuronales, y diversos experimentos han apuntado a la posibilidad de que tau contribuya a la regulación y mantenimiento de la integridad del ADN y el ARN nuclear y citoplasmático (Violet *et al.*, 2014).

2.1.3. Regulación enzimática

La interacción entre la tubulina y la proteína tau se regula principalmente por modificaciones post-traduccionales, entre las que encontramos fosforilación, glicosilación, ubiquitinación, oxidación... De entre estas modificaciones, cabe destacar la fosforilación, que afectará a la conformación de tau y que depende del balance entre la actividad de quinasas y fosfatasas.

Hay dos grupos principales de quinasas que fosforilan la proteína tau: quinasas prolina-dirigidas, como GSK3, cdk5, MAP quinasas y JNK, y quinasas no dirigidas por prolina como PKA, PKC y CaMKII (Avila et al., 2004). De entre estas quinasas, GSK3 se ha descrito como una de las más importantes ya que juega un papel importante en la regulación vía fosforilación de la proteína tau, tanto en situaciones fisiológicas como en situaciones patológicas (Avila et al., 2004; Frame et al., 2001).

En contraposición a las quinasas se encuentran las fosfatasas, responsables de la eliminación de grupos fosfato de la proteína tau. De entre estas cabe destacar algunas como PP2A, PP2B y PP2C, siendo PP2A la que se cree que actúa sobre la mayor parte de los sitios de fosforilación de tau (Avila et al., 2004; Michel Goedert, 1997; Gong et al., 2000).

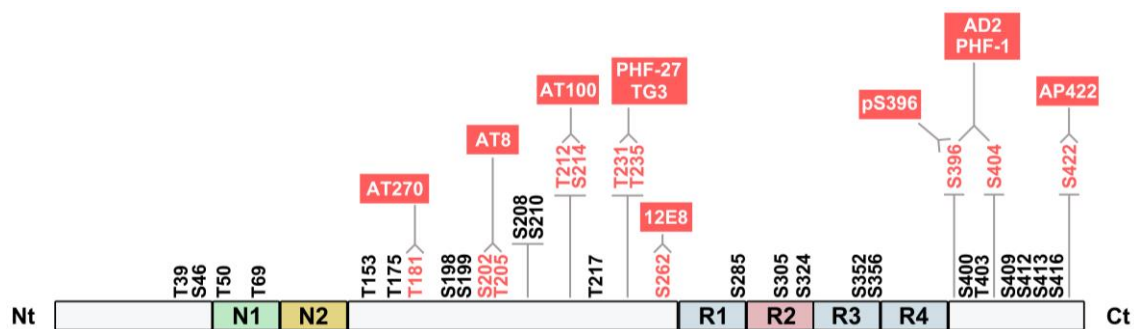


Figura 2| Representación esquemática de los sitios de fosforilación más relevantes de la proteína tau y los anticuerpos específicos los detectan (rectángulos rojos).

En la isoforma más larga de la proteína tau existen 80 posibles sitios de fosforilación, de los cuales, algunos residuos de Thr o Ser (destacados en rojo en la Figura 2) resultan particularmente interesantes ya que son dianas para diversas quinasas y se han encontrado anormalmente fosforilados en múltiples enfermedades neurodegenerativas como la EA (Hanger et al., 2009).

Con el fin de estudiar los procesos de fosforilación de la proteína tau, se utilizan anticuerpos específicos para la detección de la proteína tau fosforilada en diversos residuos. Cabe destacar el anticuerpo AT8, que detecta el epítipo formado por los residuos Ser202 y Thr205 fosforilados, aunque algunos estudios defienden la detección de la fosforilación en la Ser208 junto con las anteriores (Malia *et al.*, 2016). Diversos estudios han demostrado que este anticuerpo puede detectar estadios tempranos de la fosforilación de tau (Goedert et al., 1996). Además, es capaz de reconocer la fosforilación de tau en esas posiciones en distintas especies, como humano, ratón y hámster, y es uno de los anticuerpos más empleados en los estudios relacionados con la fosforilación de la proteína tau (Arendt *et al.*, 2003; Merino-Serrais *et al.*, 2013; Bullmann *et al.*, 2016). Por ejemplo, Braak y colaboradores lo emplearon para establecer una escala para clasificar el grado de progreso en la EA (*vid.* Introducción apartado 1.2.1. *Enfermedad de Alzheimer (EA)*). Otros de los anticuerpos muy utilizados y empleados también en la presente tesis doctoral son AT100, que detecta la fosforilación de tau en los aminoácidos Thr212 y Ser214, y el anticuerpo pS396, que detecta la fosforilación de tau en el aminoácido Ser396. Este último se ha descrito como un sitio de fosforilación tardía de la proteína tau, encontrándose en los ovillos neurofibrilares (Kimura *et al.*, 1996).

2.2. *Taupatías*

Como se introducía en el apartado anterior, la fosforilación o modificación anómala de la proteína tau se ha hallado en diversas patologías. Este grupo de patologías, reciben el nombre de taupatías (Avila et al., 2004). Se ha demostrado que la hiperfosforilación de tau interfiere con la función neuronal, en el transporte axonal o en la respiración oxidativa (Mietelska-Porowska *et al.*, 2014). Algunos ejemplos de taupatías son: Parálisis Supranuclear Progresiva (PSP), Enfermedad de Pick, Degeneración cortico basal (CBD), Enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, Síndrome de Down o Enfermedad de Alzheimer (Infante Velázquez *et al.*, 2002; Wang and Mandelkow, 2016).

2.2.1. *Enfermedad de Alzheimer (EA)*

La EA es la taupatía mejor estudiada y más común y la mayor causa de demencia asociada a la edad. Se caracteriza por un deterioro cognitivo progresivo que no solo afecta a la pérdida de información en cuanto a memoria, orientación y lenguaje, sino que afecta también a otros componentes cognitivos más complejos como la personalidad, comportamiento o habilidad para resolver problemas (Alzheimer, 1907; Morishima-Kawashima and Ihara, 2002; Manuscript, 2013; Iqbal, Liu and Gong, 2016).

Hay dos tipos principales de EA: familiar (5% de los casos diagnosticados) y esporádica (95% de los casos diagnosticados). La EA familiar es hereditaria y aparece a una edad temprana (40 años aproximadamente). La esporádica no tiene un componente hereditario tan marcado como la familiar y aparece normalmente a edades más avanzadas (65 años aproximadamente). Ambos tipos de EA comparten el mismo patrón anatómico-patológico y los síntomas clínicos (Bekris *et al.*, 2010).

A nivel clínico, inicialmente, la EA cursa con pequeños problemas de memoria que se van haciendo más notables con el progreso de la enfermedad hasta que llega un punto en el que el paciente no es capaz de seguir con su actividad diaria. Los síntomas de la EA se dividen en tres estadios: estadio inicial (demencia leve), estadio intermedio (demencia moderada) y estadio avanzado (demencia severa) (Medina and Avila, 2014). Es importante destacar que la EA se caracteriza generalmente por tener un periodo preclínico asintomático muy largo,

durante el cual se comienzan a producir alteraciones a nivel molecular, sin que se reflejen en la sintomatología. Uno de los retos con respecto a la EA es su diagnóstico temprano, antes de que esos signos preclínicos se hagan irreversibles (Deture and Dickson, 2019).

En cuanto a la neuropatología, las alteraciones en la EA son claramente distintivas. Macroscópicamente se observa una remarcable atrofia en la formación del hipocampo y en áreas corticales como el lóbulo temporal y el frontal, acompañada de una dilatación de los ventrículos.

A nivel microscópico, tienen lugar una serie de alteraciones en diversas aéreas cerebrales, incluyendo el hipocampo, la neocorteza y algunas regiones subcorticales. Alois Alzheimer (1864-1915) ya describió dos elementos neuropatológicos especialmente distintivos de la EA: placas seniles y ovillos neurofibrilares intracelulares (NFT, del inglés *neurofibrillary tangle*) (Alzheimer, 1907). Adicionalmente, existen otras alteraciones secundarias comunes, como son los restos de neuritas distróficas y los hilos o filamentos de neuropilo (NT del inglés *neuropil threads*), así como la microglía activada y los astrocitos reactivos, y otras menos frecuentes, como la aparición de los cuerpos de Hirano, la degeneración granulo vacuolar y la angiopatía amiloide. Además, la EA suele cursar con otras patologías moleculares entre las que destacan las alteraciones en las proteínas α -sinucleína y TDP43 (Deture and Dickson, 2019).

Las placas seniles o placas de amiloide- β (placas A β) se generan debido a la acumulación extracelular anómala de los péptidos β -amiloide40 (A β 40) y β -amiloide42 (A β 42) que resultan de un procesamiento anormal de la proteína precursora de amiloide junto con restos de dendritas o axones degeneradas y fragmentos de glía, así como fibras de proteína tau hiperfosforilada (Braak et al., 2006; Kumar et al., 2015) (Figura 3 A y D). El estudio publicado por Furcila y colaboradores en 2018 describe la presencia, en cerebros de pacientes con EA de placas seniles compuestas únicamente por péptido β -amiloide, placas seniles mixtas compuestas por proteína tau hiperfosforilada y péptido A β y placas seniles compuestas únicamente por restos de neuronas y fibras de proteína tau hiperfosforilada, siendo las segundas las más frecuentes y las ultimas las menos frecuentes (Furcila et al., 2018).

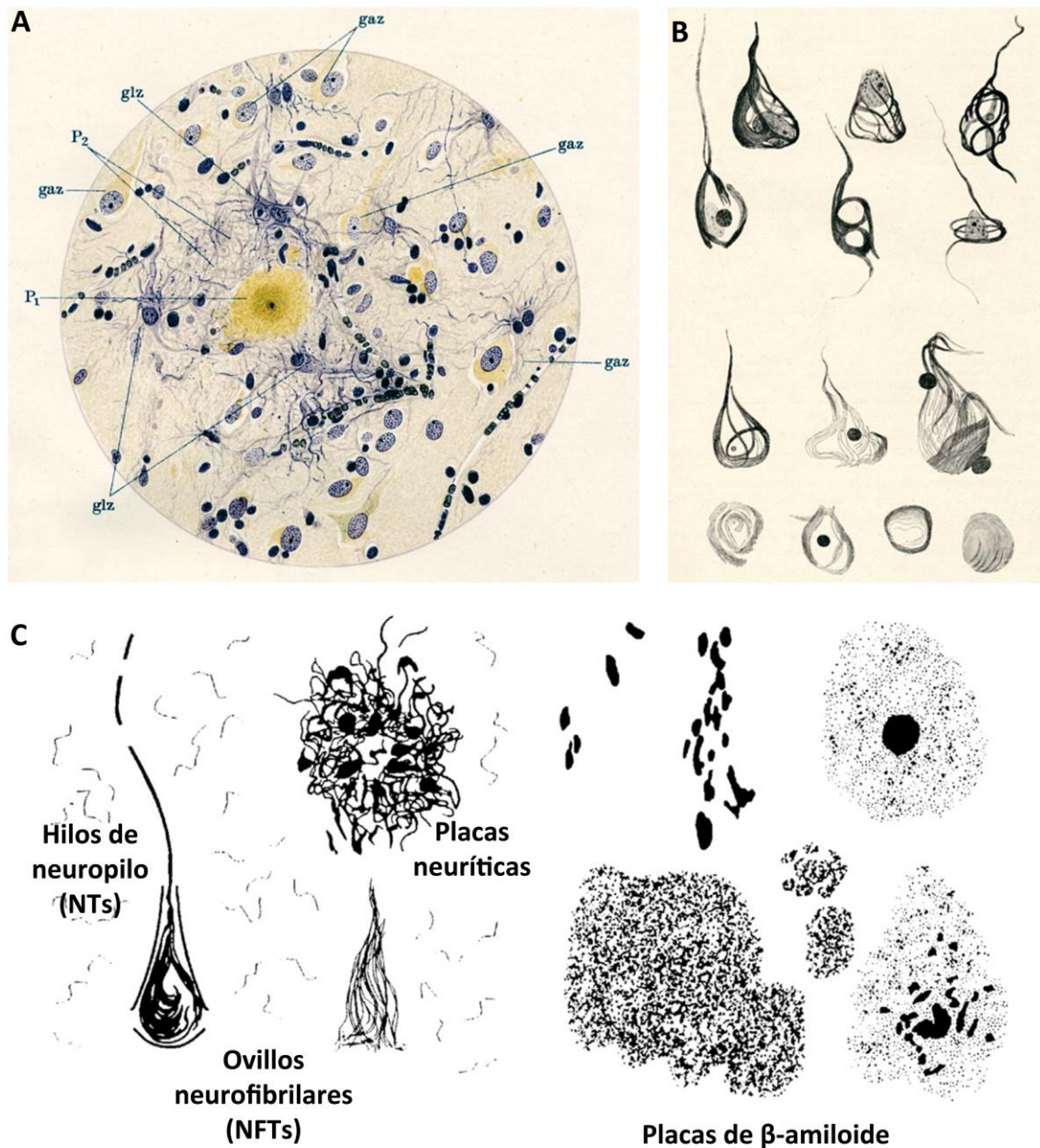


Figura 3| (A-B) Ilustraciones de Alöis Alzheimer en las que muestra placas seniles y ovillos neurofibrilares (A) y distintas morfologías de ovillos neurofibrilares (B) (Alzheimer, 1911). (C) Ilustraciones de Braak y Del Tredici-Braak en las que se muestran los principales hitos neuropatológicos de la EA: hilos de neuropilo, ovillos neurofibrilares, placas neuríticas y placas seniles (Braak and Del Tredici, 2015).

Los ovillos neurofibrilares se describieron por primera vez bajo el término "neurofibrillas" que formaban agregados en el interior de las neuronas (Figura 3 A-C) (Alzheimer, 1907; Ryan, 2016). Hoy sabemos que, cuando la proteína tau se fosforila de manera anómala comienza a desprenderse de los microtúbulos y a agregar, formando los llamados filamentos helicoidales pareados (PHF del inglés *paired helical filament*). Estos filamentos reciben su nombre por presentar un

patrón periódico en forma de doble hélice que se puede apreciar mediante técnicas de microscopía electrónica. Brevemente, se componen de dos filamentos de unos 10 nm de diámetro que se enrollan formando estructuras con una vuelta de hélice de 75-80 nm (Friedhoff *et al.*, 2000). Por otro lado, además de los PHFs, durante la EA se observa otro tipo de estructura filamentosa en el interior de las neuronas: filamentos rectos (SF del inglés *straight filaments*), que muestran menos periodicidad que los anteriores (Perl, 2010). Durante la progresión de la patología, los PHFs continúan el proceso de agregación hasta formar los ovillos neurofibrilares, tóxicos para las neuronas. Además de localizarse en los NFTs, tanto los PHFs como los SFs se encuentran también en los hilos de neuropilo (Braak *et al.*, 1986; Braak, Braak and Mandelkow, 1994)(Braak *et al.*, 1994; Braak *et al.*, 1986).

La detección de los NFTs se ha hecho tradicionalmente mediante métodos de tinción histológica como la tinción de plata de Bielschowsky o la tioflavina-S. Sin embargo, más recientemente se han desarrollado anticuerpos específicos para la detección de la proteína tau hiperfosforilada (*vid.* Introducción apartado 2.1.3. *Regulación enzimática de la proteína tau*) o determinadas conformaciones de esta, facilitando enormemente el estudio de los NFTs y los NTs, así como su localización y composición (Serrano-Pozo *et al.*, 2011).

La formación de los NFTs tiene lugar de manera progresiva, describiéndose, a modo de consenso, tres estadios. El primero de ellos es la formación de los pre-ovillos o estructuras de tipo granular que contienen proteína tau alterada, pero que aún no han llegado a formar fibras y no son detectables mediante los métodos de tinción tradicionales específicos para la detección de estructuras fibrilares, como la tioflavina S o el rojo Congo y sus derivados. El siguiente estadio sería el de filamentos agregados, en el que se encuentran NFTs en la zona del soma y las prolongaciones celulares proximales, detectables con los métodos de marcaje tradicionales y que pueden tener morfologías variadas. En algunos estudios, estos ovillos se han denominado ovillos intracelulares (iNFTs del inglés *intracellular neurofibrillary tangles*) (Augustinack *et al.*, 2002; Perl, 2010). Por último, los NFTs maduros, ubicados en el soma celular, que desplazan el núcleo y terminan por acabar con la viabilidad de la célula que lo contiene, formando así los "ovillos

fantasma" o NFTs extracelulares (eNFTs del inglés *extracellular neurofibrillary tangles*) (Augustinack *et al.*, 2002). Diversos estudios han encontrado una relación entre la fosforilación secuencial de la proteína tau y la severidad y el avance de la EA, destacando el estudio llevado a cabo en 2002 por Augustinack y colaboradores en el que describen que, además del avance a nivel de áreas cerebrales afectadas durante la EA, existe un patrón temporal en cuanto a los epítomos de tau hiperfosforilada y al tipo de NFTs que se generan que correlaciona de manera positiva con la patología a nivel celular. Este estudio sugiere que ciertos anticuerpos como pS262, TG3 o pT175/pT181, son inmunorreactivos al inicio de la patología neurofibrilar; otros como pS422 o pS214 estarían presentes en el siguiente estadio de formación de los NFTs y, por último, otros anticuerpos como AT100, AT8 o PHF-1 (*vid.* Figura 2) estarían presentes en estadios tardíos de formación de los NFTs y en los ovillos fantasma (Augustinack *et al.*, 2002).

Sin embargo, el avance de la fosforilación de tau durante el desarrollo de la EA es un tema controvertido. Otros estudios sugieren que la fosforilación en los residuos Ser202 y Thr205 (epítipo reconocido por el anticuerpo AT8) promueve un cambio temprano en el citoesqueleto que juega un papel central en las posteriores fosforilaciones de tau, encontrándose en los pre-ovillos y en los filamentos agregados, así como en los NFTs (Braak *et al.*, 1994; Goedert *et al.*, 1996). Sheng-Fischhofer y colaboradores demostraron que, si la Ser214 se fosforila antes que los aminoácidos mencionados anteriormente, se da un bloqueo ("protección") de la fosforilación en los sitios próximos a AT8 y en la Thr212 (Sheng-Fischhofer *et al.*, 1998). Por otro lado, existen estudios que describen la fosforilación de tau en los residuos Ser396 y Ser404 como uno de los eventos más tempranos de la EA, junto con la alteración de la región c-terminal (Fasulo *et al.*, 2000; Luna-Muñoz *et al.*, 2007). Además de esto, Luna-Muñoz y sus colaboradores han caracterizado la aparición, de manera secuencial, de epítomos de tau hiperfosforilada, describiendo así, que la fosforilación de 212/214 tiene lugar después de la fosforilación en los aminoácidos en posiciones 202/205 (Luna-Muñoz *et al.*, 2007). En general, a pesar de que estos estudios sugieren que los agregados tóxicos de proteína tau hiperfosforilada se forman de manera secuencial, se requieren más estudios para comprobar si hay una relación directa con el avance de la patología y la neurodegeneración (Regalado-Reyes *et al.*, 2019).

Heiko y Eva Braak propusieron en 1991 seis estadios que explicarían la progresión clínico-patológica de la enfermedad (Braak and Braak, 1991) en función de la localización y densidad de NFTs, empleando únicamente el anticuerpo AT8 (Figura 4):

- Estadio I: alteraciones en la región transentorrinal, donde comienzan a visualizarse neuronas inmunorreactivas para el anticuerpo AT8 (AT8-ir) que muestran dicho marcaje tanto en el soma como en las prolongaciones celulares (Figura 4 A).
- Estadio II: alteraciones desde la región transentorrinal hasta la región entorrinal, especialmente afectando a las capas superficiales de la corteza. Además, neuronas AT8-ir comienzan a aparecer en áreas del hipocampo como CA1 y CA2 (Figura 4 B).
- Estadio III: la región entorrinal muestra una mayor densidad de neuronas AT8-ir y estas comienzan a alcanzar la corteza temporal. En cuanto al hipocampo, tanto las áreas CA1 y CA2 muestran mayor densidad de neuronas AT8-ir y comienzan a aparecer también en la región CA3 (Figura 4 C y D).
- Estadio IV: aumenta la densidad de neuronas AT8-ir en las regiones ya afectadas. Además, comienzan a visualizarse neuronas AT8-ir en las regiones del subículum y CA4 del hipocampo, y la densidad de estas en el área CA3 del hipocampo aumenta considerablemente. La patología avanza hacia regiones de la neocorteza, observando un gran número de neuronas AT8-ir en la corteza temporal. La corteza occipital se mantiene intacta (Figura 4 E).
- Estadio V: la patología avanza por el lóbulo temporal alcanzando ya otras regiones corticales del lóbulo frontal, parietal y occipital. La región visual primaria muestra muy pocos signos de la patología, con escasos NPs y alguna neurona AT8-ir muy aislada (Figura 4 F y G).
- Estadio VI: el último estadio, en el que la mayoría de las áreas de la neocorteza se ven afectadas por la patología, exhibiendo un gran número de neuronas AT8-ir. En la región occipital, la patología alcanza la zona del estriado (Figura 4 H e I).

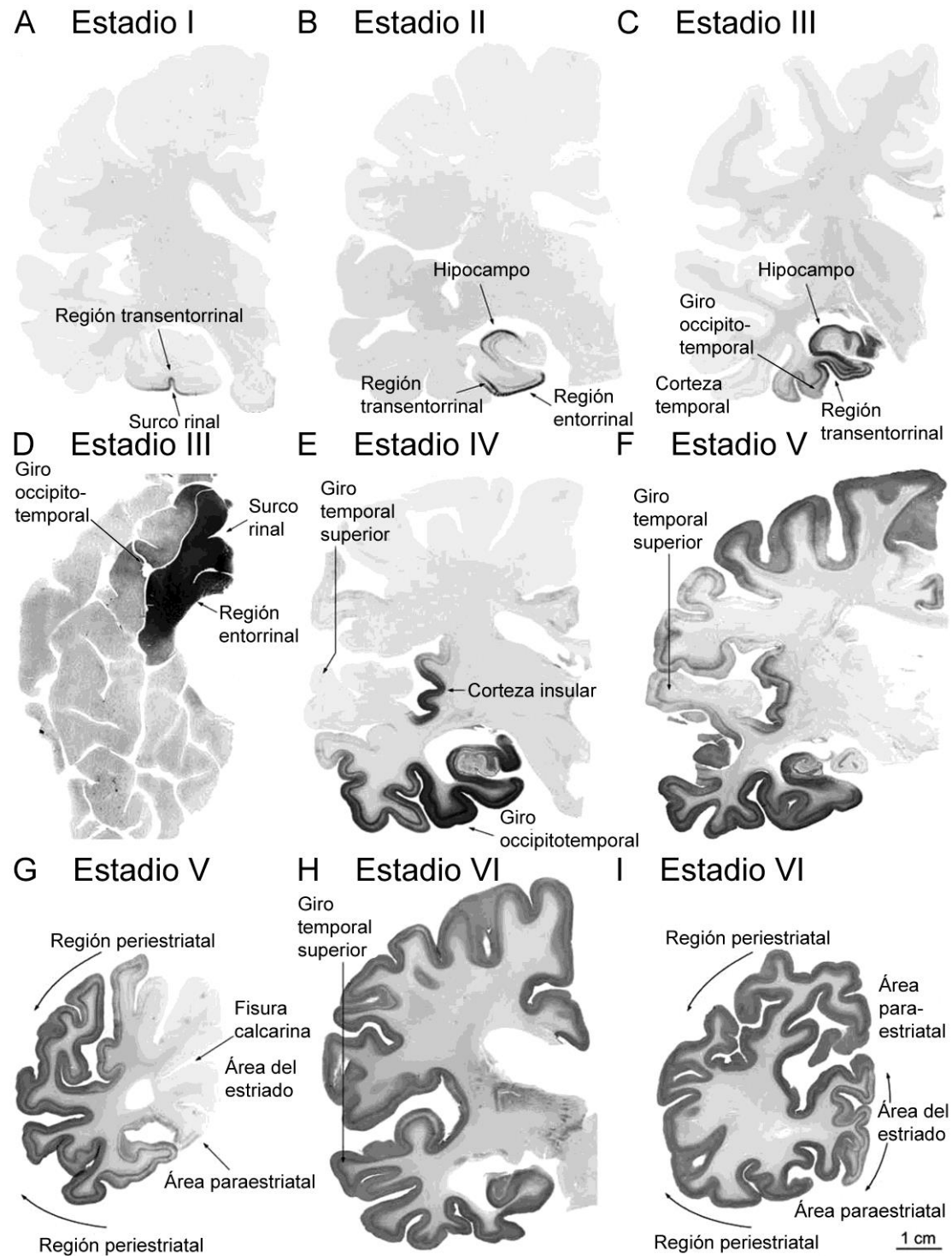


Figura 4| Representación del avance de la patología de tau según describieron Heiko y Eva Braak en 1991 (Figura adaptada de Braak et al., 2006).

Además de la Escala de Braak, existen otros métodos para evaluar el avance de la EA, como la medida semicuantitativa de Thal que evalúa la fase de progresión en función de la proteína A β o la puntuación CERAD (del inglés *Consortium to*

Establish a Registry for Alzheimer's Disease), que evalúa la progresión de la patología mediante una valoración semicuantitativa de las placas seniles. El *National Institute on Aging and Reagan Institute (NIA-RI)* recomienda una combinación de la Escala de Braak y la escala CERAD para hacer un diagnóstico neuropatológico completo del estadio en el que se encuentra la EA (Brunnström and Englund, 2011).

Brevemente, la escala CERAD evalúa la progresión de la patología mediante una valoración semicuantitativa de las placas seniles, midiendo la frecuencia de estas, pudiendo ser: nula, dispersa, moderada o frecuente, en tres áreas del cerebro: giro frontal medio, giros temporales medio y superior y lóbulo parietal inferior. La frecuencia con la que aparecen las placas seniles se combina con la edad del paciente para obtener la puntuación CERAD, que va desde 0 (sin presencia de placas seniles) a C (Enfermedad de Alzheimer), pasando por A (poca evidencia de EA) y B (probable EA). Así, en pacientes menores de 50 años, la presencia de placas seniles de manera dispersa o más (moderada o frecuente) se considera estadio C. En pacientes entre 50 y 75 años, la presencia de placas seniles dispersa se considera estadio B y de forma moderada o frecuente se considera estadio C. Por último, en pacientes mayores de 75 años, la presencia de placas seniles de forma dispersa se considera estadio A; de forma moderada, estadio B; y de forma frecuente estadio C.

Por todo lo anterior, los pacientes obtendrán una puntuación de I a VI en la Escala de Braak y una puntuación de 0 a C en la escala CERAD.

2.3. *Corteza cerebral y formación del hipocampo*

Como se expone en el apartado anterior, la EA comienza por la región de la corteza entorrinal y transentorrinal y, posteriormente, se expande hacia otras áreas, como el hipocampo o la neocorteza. Además, centrándonos en la patología de tau, parece afectar únicamente a neuronas piramidales. Por ello, los siguientes apartados se centran en una breve introducción a la corteza cerebral y el hipocampo y a sus principales componentes, las neuronas piramidales, que serán objeto de estudio en la presente tesis doctoral.

2.3.1. Corteza cerebral

La corteza cerebral es el área más externa del cerebro, así como el área de mayor tamaño, en la que se lleva a cabo integración de información y juega un papel crucial en procesos como la memoria, el lenguaje, la percepción, pensamiento, atención y consciencia. En la mayoría de los mamíferos, la corteza cerebral se encuentra plegada, ampliando así la superficie y permitiendo un mayor número de conexiones dentro del mismo volumen craneal (White, 1989).

En cuanto a la organización citoarquitectónica de la corteza, esta se puede dividir en capas horizontales en función de la densidad de somas neuronales, fibras y tipos neuronales. Como consenso, se han establecido seis capas dentro de la corteza de los mamíferos (Figura 5) (DeFelipe and Fariñas, 1992).

Las capas de la corteza reciben su nombre en función del tipo de células que en ellas predomina y su tamaño y composición varían en función de la especie, así como en función del área cerebral (Narayanan, Udvary and Oberlaender, 2017). Así, la capa I recibe el nombre de capa plexiforme o molecular, se localiza inmediatamente bajo la pía madre y se caracteriza por tener pocas neuronas y glía y por estar compuesta principalmente por dendritas apicales procedentes de las neuronas piramidales del resto de capas corticales y colaterales axónicos procedentes de otras áreas de la corteza y de regiones subcorticales como el tálamo (Muralidhar, Wang and Markram, 2014). La capa II recibe el nombre de capa de células piramidales pequeñas, mientras que la capa III se denomina capa de células piramidales medianas y grandes superficiales. Estas dos capas frecuentemente se agrupan a nivel funcional ya que principalmente se componen de neuronas piramidales que proyectan sus axones hacia otras regiones de la corteza (Thomson, 2007). La capa IV o capa granular se compone principalmente de dos tipos de células: las células estrelladas espinosas y células piramidales. Se considera la principal entrada a la corteza del input talámico, desde la cual esta información se transmitiría al resto de las capas corticales según el circuito canónico, en el que se propone que el input llegaría a la capa IV y, desde esta, se propagaría primero hacia las capas II/III y finalmente hacia las capas V/VI, que supondrían la principal fuente de salida de la información hacia otras áreas corticales y subcorticales (Narayanan, Udvary and Oberlaender, 2017).

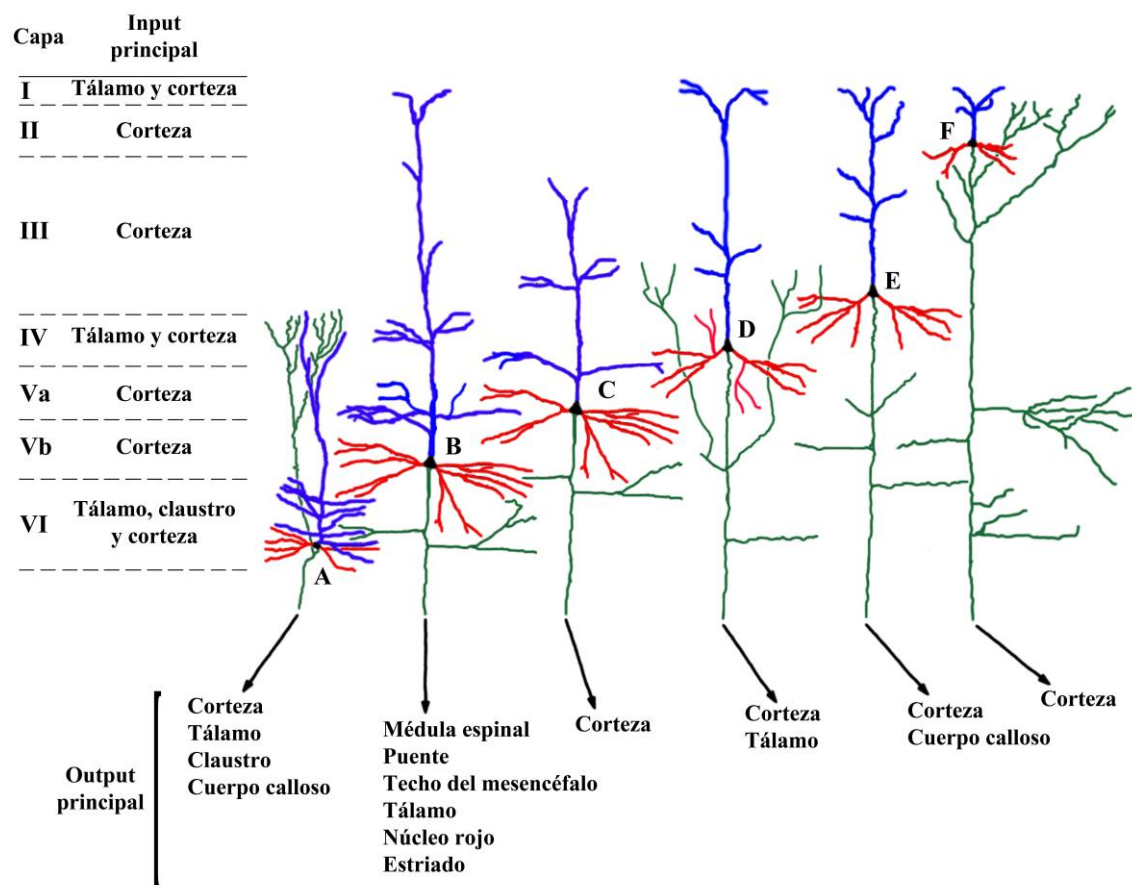


Figura 5| Representación esquemática de las capas de la corteza cerebral, así como de las neuronas piramidales presentes en cada una estas: capa VI (A), capa Vb (B), capa Va (C), capa IV (D), capa III (E) y capa II (F), elaborada en base, principalmente, a datos obtenidos en estudios realizados en mono, indicando las principales fuentes de input en cada capa (izquierda) y las principales dianas hacia las que proyectan sus axones (output principal) en cada caso. Las dendritas apicales se muestran en azul, las dendritas basales en rojo, los axones en verde y el soma celular en negro (Adaptada de DeFelipe & Fariñas, 1992).

La capa V recibe el nombre de capa de grandes células piramidales profundas, se compone principalmente de estas y se puede dividir en dos subcapas: Va y Vb. Dentro de las neuronas piramidales de la capa V se han descrito dos tipos: neuronas piramidales con penacho grueso (en inglés *thick tufted*), que tienden a localizarse en la capa Vb y las neuronas piramidales con penacho fino (traducido del término en inglés *slender tufted*), que tienden a localizarse en la capa Va. Estos dos tipos de células son diferentes a nivel morfológico y funcional. Con respecto a su morfología, cabe destacar que las dendritas apicales de las neuronas piramidales con penacho grueso alcanzan las capas más superficiales, llegando normalmente a la capa I, mientras que las de las neuronas piramidales de penacho fino terminan antes, en las capas II/III. A nivel funcional, las neuronas

piramidales con penacho grueso suponen la principal fuente de output fuera de la corteza, enviando sus axones a diversas regiones subcorticales como la médula espinal, el tálamo o el estriado, mientras que las neuronas piramidales con penacho fino suponen una importante fuente de output a otras áreas corticales (Thomson, 2007; Oberlaender *et al.*, 2012; Narayanan *et al.*, 2015; Krieger, De Kock and Frick, 2017). Por último, la capa VI o capa polimórfica, también llamada capa de células fusiformes o capa multiforme, se compone principalmente de neuronas piramidales que proyectan tanto a diversas áreas de la corteza como a regiones subcorticales, principalmente el tálamo (Thomson, 2007, 2010; Markram *et al.*, 2014; Oberlaender *et al.*, 2017).

Además de las capas horizontales, existe en la corteza cerebral una organización vertical que Llorente de Nó describió ya en 1938 (Lorente de No, 1938). Lorente de Nó introdujo el concepto fundamental de “unidad cortical elemental de operación” que más tarde sirvió para elaborar la hipótesis de la columna cortical como elemento unitario, y que actualmente representa la principal hipótesis sobre la organización funcional de la corteza cerebral (e.g. Mountcastle, 1997). Esta organización vertical se compone de grupos de neuronas que se encuentran conectadas entre sí. Además, dentro de estas columnas, las dendritas apicales de las células piramidales localizadas en distintas capas corticales ascienden formando pequeñas agrupaciones. DeFelipe, en un trabajo publicado en 2005, discute las posibles funciones de dicho agrupamiento dendrítico, contemplando la posibilidad de que se deba al establecimiento de patrones de conectividad particulares con inputs comunes (DeFelipe, 2005a). Así, las agrupaciones dendríticas a lo largo de la corteza supondrían puntos o dianas post-sinápticas locales y regularmente distribuidos en las que se concentrarían las conexiones, funcionando como una especie de unidad funcional dentro de las columnas corticales (DeFelipe and Fariñas, 1992; DeFelipe, 2005a).

2.3.2. Formación del hipocampo

El hipocampo es una de las regiones del cerebro más y mejor estudiadas ya que, además de que, evolutivamente está muy conservada (Stephan and Andy, 2006), juega un papel muy importante en la formación y recuperación de

memorias, así como en diversos sistemas emocionales, sensoriales y cognitivos (Insausti and Amaral, 2004; Squire and Dede, 2015; Squire *et al.*, 2015).

Pertenece al sistema límbico y, en el caso de los humanos, el hipocampo es una estructura alargada que se encuentra en el interior del lóbulo temporal. En roedores, tiene forma de anacardo y se encuentra debajo de la neocorteza. A nivel anatómico, consta de una serie de áreas de entre las que cabe destacar aquellas involucradas en el circuito conocido como bucle trisináptico: la corteza entorrinal, que supone el mayor input cortical hacia el hipocampo proyecta al giro dentado (sinapsis 1); el giro dentado proyecta al área CA3 (sinapsis 2); CA3 proyecta al área CA1 (sinapsis 3); y, finalmente, el área CA1 vuelve a proyectar a la corteza entorrinal, finalizando el circuito. Además, existe una zona de transición entre las áreas CA1 y CA3 denominada CA2 con funciones independientes a las otras áreas (Figura 6).

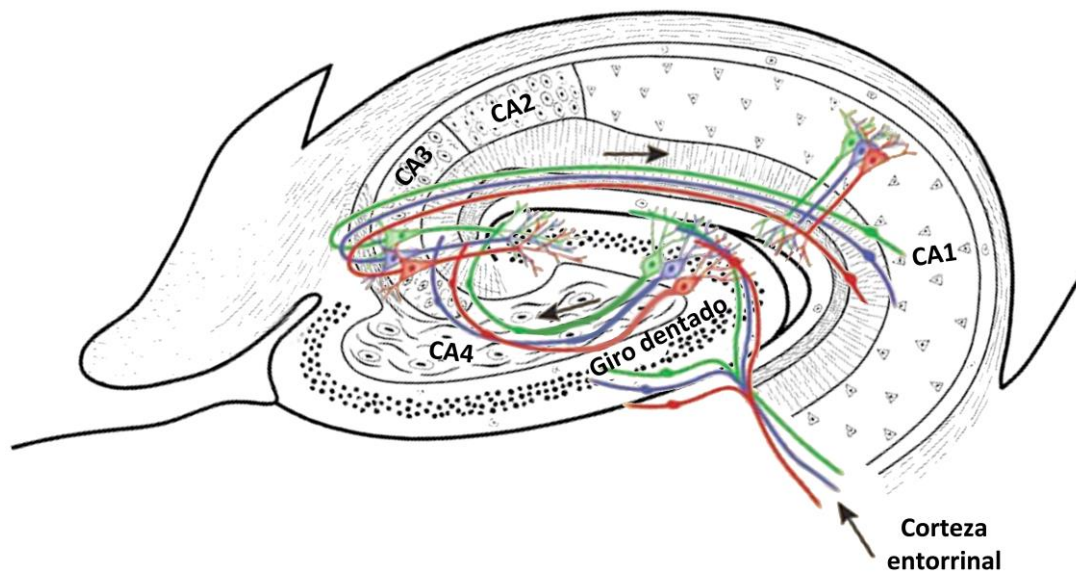


Figura 6| Ilustración de una sección coronal del hipocampo humano en la que se muestran las áreas: CA1, CA2, CA3, CA4 y giro dentado, y se representa el bucle trisináptico (neuronas de color verde, rojo y azul), en el que las neuronas de la corteza entorrinal proyectan al giro dentado (primera sinapsis), el giro dentado proyecta a las neuronas del área CA3 (segunda sinapsis) y estas proyectan al área CA1 (tercera sinapsis) (Modificada de Duvernoy, 2005).

El área CA1 es particularmente interesante ya que, durante el proceso evolutivo, la capa piramidal de dicha área avanzó hacia una conformación mucho menos empaquetada que en otras especies como, por ejemplo, los roedores como

el ratón o el hámster. Este proceso no parece ser un mero reflejo del aumento de tamaño en el cerebro humano ya que, por ejemplo, en especies con cerebros más grandes que el humano, como el elefante, las células piramidales de la región piramidal de CA1 están mucho menos empaquetadas que en los primeros (Slomianka et al., 2011; Zhang et al., 2013). Este proceso, denominado "corticalización" de la capa piramidal del área CA1 humano (ya que recuerda a la arquitectura de la neocorteza), probablemente tiene un significado funcional muy importante ya que las dendritas basales y apicales de las neuronas piramidales que componen CA1 están entremezcladas a lo largo de la capa piramidal, mientras que en roedores, los árboles basal y apical se encuentran separados, encontrándose las dendritas basales en el *stratum oriens* y las apicales en el *stratum radiatum* (Benavides-Piccione et al., 2019).

2.3.3. Células piramidales.

Las células piramidales son las células más abundantes de la corteza cerebral (incluyendo el hipocampo); se estima que representan un 70-80% de la población neuronal total, y son la fuente principal de sinapsis excitatorias (glutamatérgicas) de la corteza cerebral (DeFelipe and Fariñas, 1992).

En cuanto a su estructura, las neuronas piramidales cuentan con una serie de rasgos distintivos: soma con forma piramidal u ovoide; una dendrita apical, que suele ser larga y termina en un penacho final en la parte más distal al soma. De ella emanan dendritas colaterales, y el tronco principal puede bifurcarse, generando dos dendritas apicales "gemelas" que, a su vez, pueden volver a bifurcar antes de llegar a la zona del penacho; un árbol basal compuesto de varias dendritas basales, que suelen ser cortas y localizarse en la región proximal al soma; un axón que emana de la base del soma y se ramifica, estableciendo un gran número de conexiones con otras células (Figura 7) (DeFelipe and Fariñas, 1992; Bannister and Larkman, 1995; Ito, Kato and Kawabata, 1998; Benavides-Piccione et al., 2019). Todos los componentes dendríticos están cubiertos de espinas dendríticas, sobre las cuales se profundiza en el apartado 1.3.3.1 *Espinas dendríticas* de la Introducción.

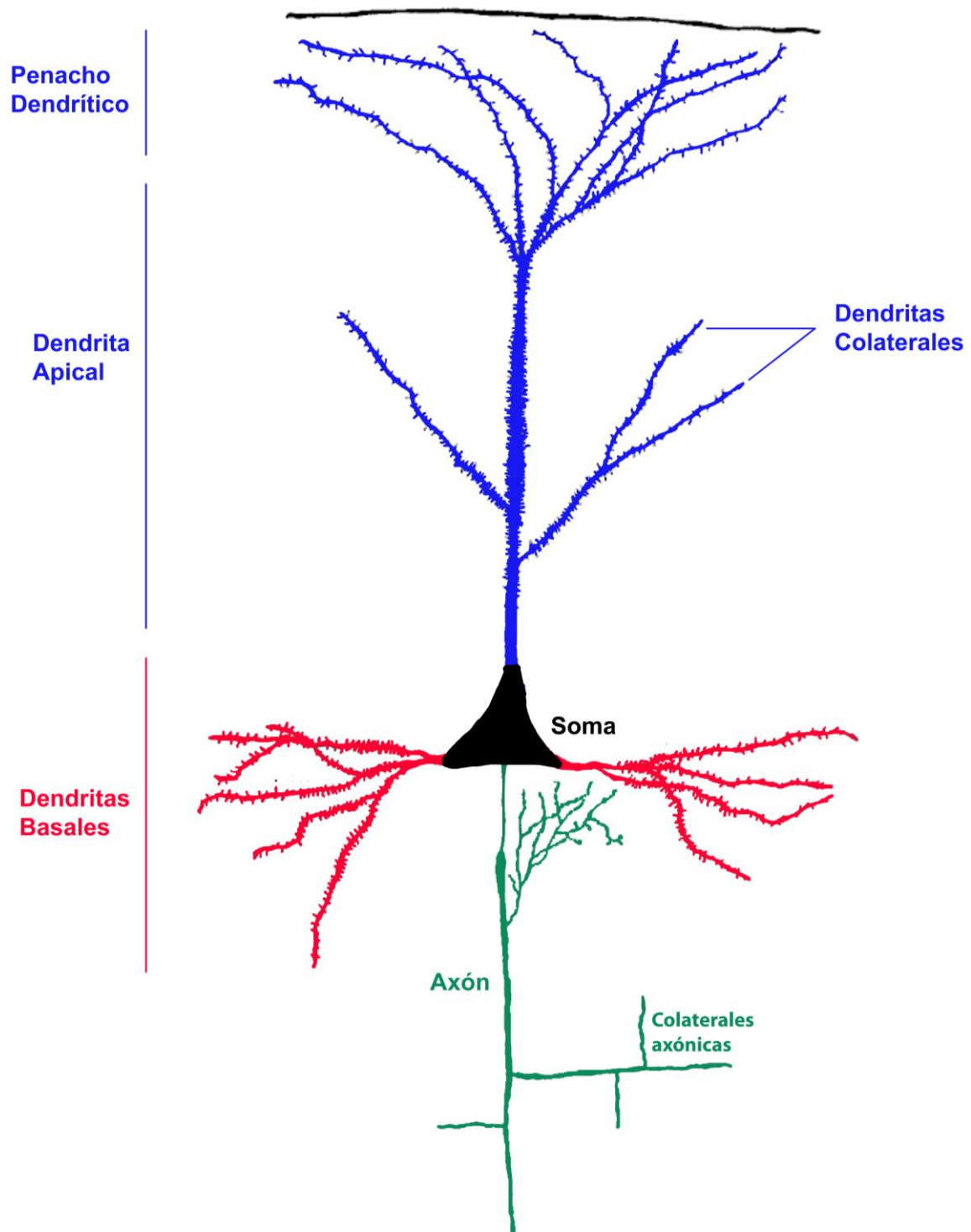


Figura 7| Representación esquemática de la morfología de una neurona piramidal en la que se muestran: el árbol apical (azul), el árbol basal (verde), el soma (negro) y el axón (rojo). Adaptada de DeFelipe, 1992.

Las células piramidales pueden recibir señales de entrada (input) provenientes de otras neuronas, tanto en el soma como en el axón y en las dendritas. El soma y el axón reciben input inhibitorio de neuronas que utilizan

principalmente el neurotransmisor GABA, mientras que la mayoría de las dendritas reciben input excitatorio de neuronas que utilizan el neurotransmisor glutamato. Además, generalmente, las dendritas más proximales reciben input de neuronas cercanas, mientras que los penachos de la dendrita apical y las zonas más distales de esta reciben input de células más lejanas y regiones subcorticales (Connors, 1994, 2003; Major, Larkum and Schiller, 2013).

A pesar de que su morfología es única y sigue un patrón determinado, existen grandes variaciones dependiendo del área o la capa (en el caso de la corteza) en la que se encuentren y, por supuesto, la especie. Por ejemplo, las neuronas piramidales localizadas en el área asociativa temporal y en el lóbulo prefrontal de los primates muestran mayor complejidad dendrítica que aquellas localizadas en las áreas sensoriales (Elston, Benavides-Piccione and DeFelipe, 2001; Jacobs *et al.*, 2001; Bianchi *et al.*, 2013). En los roedores también se observan estas diferencias en cuanto a estructura en función de las áreas, aunque estas variaciones son menos marcadas que en humanos (Benavides-Piccione *et al.*, 2002, 2006, 2019; Ballesteros-Yáñez *et al.*, 2010; Rojo *et al.*, 2016; Deitcher *et al.*, 2017). Puesto que las diferencias en la morfología de los árboles dendríticos pueden influenciar las propiedades biofísicas y computacionales de las células, la distinta morfología de las neuronas piramidales no solo es importante a nivel de la organización del cerebro, sino que son también muy relevantes desde el punto de vista evolutivo y comparativo (DeFelipe, 2011).

2.3.3.1 Espinas dendríticas

Como se adelantaba en el apartado anterior, las dendritas (tanto apical como basales) de las neuronas piramidales están cubiertas por miles de pequeñas protuberancias denominadas espinas dendríticas, que son la principal diana post-sináptica de las sinapsis excitatorias en la corteza cerebral y es por ello por lo que las células piramidales se consideran los elementos fundamentales en la estructura de la neocorteza. Fueron descritas por primera vez en 1888 por Santiago Ramón y Cajal cuando observó que la superficie de las células de Purkinje en el cerebelo tenía aspecto rugoso, con pequeñas protrusiones (Cajal, 1888). Posteriormente, Cajal describió dichas estructuras en diversos tipos celulares y regiones cerebrales, así como en diversas especies (DeFelipe, 2015).

En general, las espinas dendríticas son pequeñas protrusiones que emanan del tallo dendrítico que miden entre 0.5 y 2 μm de longitud (pudiendo llegar a los 6 μm en el área CA3 del hipocampo), y tienen un volumen de entre 0,01 y 0,8 μm^3 de media (Hering and Sheng, 2001) (Figura 8). Por lo general, cuentan con un cuello fino y una cabeza con un volumen mayor pero su morfología resulta variable y se ha propuesto que diferentes morfologías en las espinas podrían estar correlacionadas con distintas funciones. Así, las espinas finas y pequeñas, que son más plásticas y fáciles de eliminar, podrían contribuir más a los procesos de aprendizaje mientras que las espinas más grandes y voluminosas estarían más implicadas en procesos de establecimiento y almacenamiento de memorias (Hering and Sheng, 2001; Kasai *et al.*, 2003; Bourne and Harris, 2007; Yuste, 2010; Harris and Spacek, 2016).

Las espinas dendríticas son muy plásticas y variables tanto en su estructura y tamaño como en cuanto a los receptores, las proteínas u orgánulos que contienen. En general, el tamaño de la espina se asocia a un mayor contenido de estos. Brevemente, en cuanto a los componentes de las espinas dendríticas, cabe destacar la densidad postsináptica (PSD, por sus siglas del inglés *post synaptic density*) que representa una región engrosada electrodensa en la membrana plasmática en la hendidura sináptica, que generalmente se encuentra en la cabeza de la espina dendrítica. La PSD ocupa aproximadamente un 10% de la superficie de la cabeza de la espina. Es en esta región en la que se concentran la mayoría de los receptores postsinápticos, entre los que cabe destacar los receptores de glutamato de tipo AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico) y tipo NMDA (N-metil-D-aspartato). Puesto que, a mayor tamaño de la cabeza de la espina dendrítica, mayor es el tamaño de la PSD, espinas más grandes contarán con un mayor número de receptores postsinápticos (Hering and Sheng, 2001).

En cuanto a la función de las espinas dendríticas y al porqué de su existencia, Cajal ya hipotetizó que suponen un mecanismo para aumentar la superficie de las dendritas y, así, aumentar el número posible de conexiones (Cajal, 1899, 1904). Los avances en tecnología han permitido profundizar más aun en este tema, destacando las siguientes funciones de las espinas dendríticas: regulación de cada sinapsis de manera independiente y aislada a nivel pre- y post- sináptico;

expansión de la capacidad computacional de las neuronas; compartimentalización de las señales bioquímicas postsinápticas (Crick, 1982; Yuste and Majewska, 2001; Lee, Soares and Béïque, 2012).

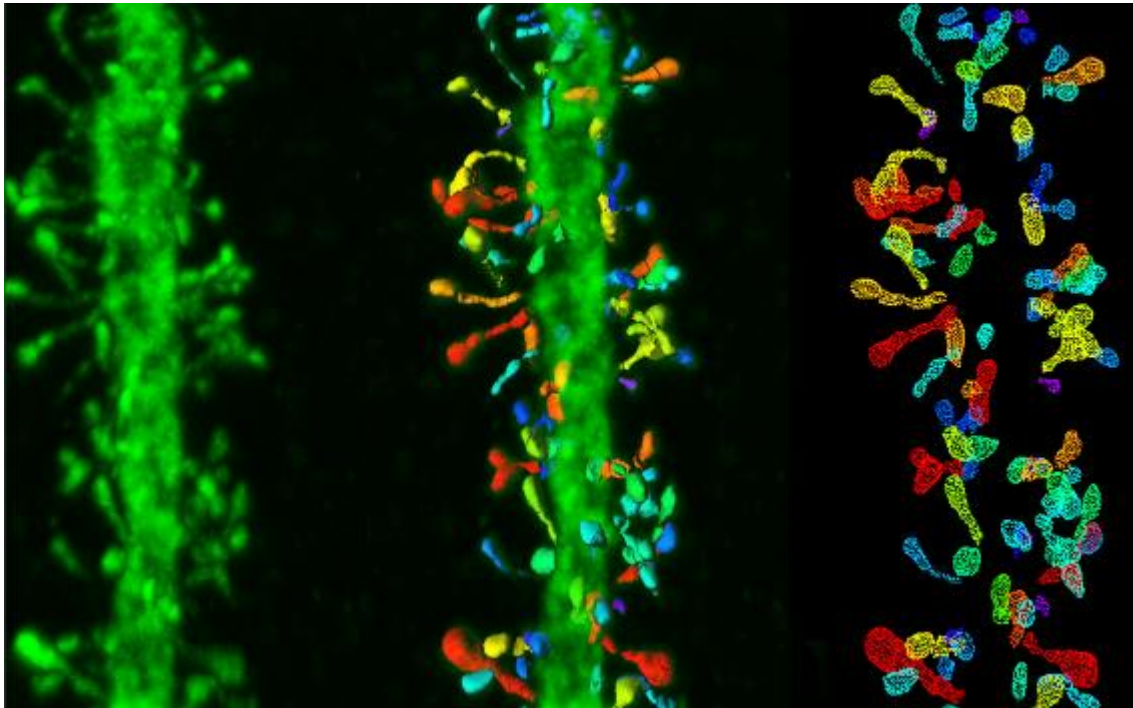


Figura 8| (A) Imagen de una dendrita apical perteneciente a una neurona piramidal de capa III de la corteza cingulada humana en la que se observan las espinas dendríticas y sus distintas morfologías. (B) Reconstrucción tridimensional de cada una de las espinas dendríticas. (C) Malla tridimensional empleada para estimar el área de cada una de las espinas. El color de cada espina varía según su área, siendo el azul $0,6 \mu\text{m}^2$ y el rojo $6,0 \mu\text{m}^2$. (Imagen de Heck & Benavides-Piccione, 2015).

Uno de los aspectos más estudiados es la relación entre las espinas dendríticas y los procesos relacionados con la memoria y el aprendizaje. Diversos estudios han demostrado la influencia de éstas en los procesos de potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés *long term potentiation*). Así, la estimulación del hipocampo empleando parámetros similares a los que se usan para promover la LTP resultó en un incremento de la densidad de espinas dendríticas, así como un aumento en su tamaño (Fifková and Van Harreveld, 1977; Greenough, Larson and Withers, 1985; Desmond and Levy, 1986). Puesto que el diámetro y volumen de la cabeza de las espinas dendríticas se ha correlacionado positivamente con la fuerza de las sinapsis (magnitud de la variación en el potencial de membrana del terminal postsináptico a causa de la interacción

neurotransmisor-receptor), cambios morfológicos en las espinas dendríticas podrían ser los sustratos anatómicos de un aumento de la eficiencia sináptica. Por otro lado, diversos estudios que inducen la de-potenciación sináptica (LTD, por sus siglas en inglés *long term de-potentialtion*), proceso opuesto a la LTP, pueden causar retracción de las espinas dendríticas, así como una disminución en la densidad de estas (Nägerl *et al.*, 2004; Zhou, Homma and Poo, 2004; Wang, Yang and Zhou, 2007). Cabe destacar que la mayor parte de los estudios citados anteriormente en los que se describen variaciones en la morfología y densidad de las espinas dendríticas apuntan a que es un proceso muy heterogéneo en función del área o la población neuronal analizada o incluso variable dentro del mismo tallo dendrítico (Yuste and Bonhoeffer, 2001; Bosch and Hayashi, 2012).

En relación con lo anterior y con los procesos de plasticidad sináptica, resulta importante comprender si los procesos de pérdida sináptica ocurren de manera natural en ausencia de input sináptico. A modo de ejemplo, está bien descrito el mecanismo de la poda sináptica que tiene lugar durante el desarrollo, proceso mediante el cual se generan y eliminan un 10-15% de las espinas dendríticas en un periodo de unas 24 horas con el fin de potenciar las sinapsis funcionales y descartar aquellas que no lo son (Zuo *et al.*, 2005; Attardo, Fitzgerald and Schnitzer, 2015). La plasticidad sináptica, por lo tanto, es el proceso fundamental por el cual la mayoría de los vertebrados aprenden y almacenan información. Este proceso conlleva diversos mecanismos, entre los cuales se encuentra la modificación de las sinapsis existentes o la sustitución de sinapsis antiguas por otras nuevas (Nicoll and Schmitz, 2005; Voglis and Tavernarakis, 2006). Las sinapsis suelen ser bastante estables en las neuronas maduras. Sin embargo, bajo ciertas condiciones como el input sensorial, las relaciones interpersonales, el estrés, el aprendizaje o cualquier otro paradigma del comportamiento, pueden remodelarse de la forma apropiada para favorecer la adaptación y el funcionamiento de las funciones cerebrales (Hering and Sheng, 2001; Fiala, Spacek and Harris, 2002).

La pérdida de espinas dendríticas está asociada con diversas patologías, como el estrés crónico, las adicciones o las enfermedades neurodegenerativas, como la Enfermedad de Alzheimer (Fiala, Spacek and Harris, 2002; Penzes *et al.*,

2011; Merino-Serrais *et al.*, 2013). Concretamente, el estudio publicado por Merino-Serrais y colaboradores en 2013 describe cambios en el número de espinas dendríticas, así como en el volumen de la cabeza y la longitud de las espinas en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Merino-Serrais *et al.*, 2013). Diversos estudios coinciden en que el papel que juega la proteína tau y sus alteraciones, principalmente la hiperfosforilación, resulta crucial en los procesos de pérdida y alteraciones morfológicas de las espinas dendríticas (Merino-Serrais *et al.*, 2013; Lopes *et al.*, 2016). Debido a esto, el estudio de las espinas dendríticas en las células piramidales, así como su relación con la proteína tau, representa un aspecto importante para una mejor comprensión de la EA.

2.3.4. Microglía

Las células microgliales son las principales células inmunes en el sistema nervioso central. Dependiendo de la región cerebral, la microglía representa entre un 0,5% y un 16,6% de las células totales en el cerebro humano. En condiciones fisiológicas, el número de células de microglía, así como su función se encuentran regulados por el microentorno y por la interacción con las células adyacentes (Bachiller *et al.*, 2018). En respuesta a estrés, las células de microglía tienen la capacidad de activarse, cambiando así su capacidad de proliferación, su morfología, su actividad fagocítica, la presentación de antígenos y la liberación de factores inflamatorios y citoquinas. La activación y, por tanto, el fenotipo de las células de microglía se regula en base a cambios en el entorno provocados por situaciones de estrés o patológicas (Bachiller *et al.*, 2018).

Además de las condiciones patológicas, el envejecimiento se ha asociado también con una mayor activación de la microglía. Se ha descrito que el envejecimiento tiene efectos en el control de la expresión génica, así como en la aparición de microglía distrófica, que se caracteriza por presentar alteraciones en el citoplasma, una forma más redondeada y/o un menor número de prolongaciones microgliales (ramificaciones) emergentes, además de la fragmentación de estos (Streit *et al.*, 2014; Bachiller *et al.*, 2018).

Tradicionalmente, el estado de activación de la microglía se ha clasificado en dos estadios opuestos: clásico (M1) y alternativo (M2). El estadio M1 se

considera proinflamatorio, por lo que las células de microglía producen especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (NOS) y citoquinas. M1 se considera el estado activado de la microglía, en el cual su morfología es ameboide y menos ramificada. Por otro lado, el estadio M2 se considera antiinflamatorio y se asocia a la liberación de factores tróficos como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF del inglés *brain derived neurotrophic factor*). M2 se considera un estado en reposo y la morfología de la microglía es más ramificada. Hoy en día se ha demostrado que el estado de activación de la microglía puede situarse en estadios intermedios entre M1 y M2 (Bachiller *et al.*, 2018).

Además de su implicación en la respuesta a estrés, la microglía tiene otras funciones tales como el mantenimiento de la homeostasis, la neurogénesis adulta, plasticidad, aprendizaje y contribución a la formación de espinas dendríticas entre otras (Wake and Fields, 2011).

Además de las situaciones patológicas, algunas situaciones fisiológicas en animales, como la hibernación, se han asociado con cambios en los niveles de activación de la microglía. Así, Cogut y colaboradores, en un estudio realizado en el hipocampo del hámster sirio en hibernación, describen aumentos en la expresión de citoquinas y moléculas de señalización de microglía que vuelven a su estado basal pasado dicho periodo. Se hipotetiza que estos cambios podrían tratarse de un mecanismo para prevenir el daño cerebral que podría resultar de los cambios fisiológicos que tienen lugar durante la hibernación (Cogut *et al.*, 2017).

2.4. Modelos para el estudio de la Enfermedad de Alzheimer

Hoy en día no existe un modelo animal que pueda simular de manera completa y total una enfermedad crónica como la EA. Sin embargo, existen algunos modelos, como los modelos transgénicos de ratón, que permiten estudiar los mecanismos moleculares de taupatías como la EA. Cabe destacar el modelo transgénico de ratón APP/PS1, que expresa, un precursor de proteína amiloide quimérico (combinando el gen humano y el gen de ratón) así como el gen de la preselinina-1 humano mutado (Jankowsky *et al.*, 2005). Por otro lado, existe un modelo triple transgénico de ratón APP/PS1/P301L que expresa los dos genes

anteriormente mencionados, así como un gen de proteína tau humana con la mutación P301L que imita la fosforilación anómala de la misma. Este modelo parece ser uno de los más completos pues los ratones desarrollan placas A β , así como alteraciones en la plasticidad sináptica y en la LTP (Oddo *et al.*, 2003). Centrándonos en el estudio de los fenómenos de fosforilación de la proteína tau, se han desarrollado modelos para estudiarlos en profundidad, destacando el modelo transgénico de ratón P301S que expresa la proteína tau humana con una mutación que imita la hiperfosforilación patológica de la proteína tau. A partir de los 8 meses de edad, estos ratones comienzan a manifestar pérdida neuronal y atrofia cerebral, comenzando por el hipocampo y avanzando hacia otras regiones del cerebro. Además, desarrollan patología neurofibrilar, mostrando estructuras fibrilares similares a los NFTs humanos en diversas regiones del cerebro, destacando el hipocampo, la neocorteza y otras regiones como la amígdala. Además, muestran activación de la microglía, pero no desarrollan placas seniles (Yoshiyama *et al.*, 2007).

Estudios morfológicos en este último modelo describen un descenso de la densidad de espinas dendríticas durante la progresión de la patología neurofibrilar en los penachos de las neuronas piramidales de capa V debido a, según los autores, la imposibilidad de generar nuevas espinas dendríticas durante el desarrollo. Por otro lado, demuestran un aumento en el tamaño (área y volumen) y longitud de estas. Además, demuestran la pérdida de espinas dendríticas tiene lugar antes de la aparición de los NFTs, es decir, simplemente por la presencia de proteína tau anormalmente fosforilada, lo cual implica que las especies pre-fibrilares de la proteína tau hiperfosforilada podrían ser ya tóxicas o causantes de alteraciones a nivel morfológico en las neuronas (Hoffmann *et al.*, 2014).

2.4.1. Hibernación

La hibernación es un proceso biológico que ayuda a algunos animales endotérmicos (capaces de mantener una temperatura corporal constante y elevada) a tolerar y sobrevivir en ambientes extremos, sobre todo, durante ciertas épocas del año en las que la comida escasea.

La hibernación en mamíferos podría representar un buen modelo para el estudio de los fenómenos de hiperfosforilación y desfosforilación de la proteína tau ya que, durante la hibernación, se forman estructuras similares a los PHF presentes en el cerebro de pacientes con EA. Sin embargo, en contraposición a lo que ocurre durante el proceso patológico en humanos, el proceso de la hibernación no parece generar daños neuronales ni pérdidas de memoria, sino que la hiperfosforilación de la proteína tau, así como muchos otros cambios que se asocian a este proceso revierten cuando el animal sale de la hibernación (Arendt *et al.*, 2003; Bullmann *et al.*, 2016).

Durante el proceso de hibernación los animales sufren periodos de letargo o torpor de duración variada en los que reducen su temperatura corporal, su tasa metabólica y otras funciones fisiológicas como el ritmo cardíaco, el flujo sanguíneo, la tasa de consumo de oxígeno, los ritmos respiratorios y la respuesta inmune, entre otros (Geiser, 2013).

Se pueden distinguir dos tipos de estados hipometabólicos asociados con una reducción de la temperatura corporal (Geiser, 2013; Ruf and Geiser, 2016): la hibernación —periodo largos de letargo, de varios días o incluso semanas utilizado por animales como el oso pardo, las marmotas o algunos roedores— y el torpor diurno —periodos cortos, de 3-12 horas de letargo, empleado principalmente por las aves—. Dentro del primer grupo, se distinguen a su vez los animales hibernantes obligados (la hibernación es estacional y siempre tiene lugar) y los permisivos (la hibernación puede ser inducida en cualquier época del año según las condiciones ambientales). La figura 9 ilustra algunas de las especies hibernantes. Los pequeños mamíferos como el hámster sirio (*Mesocricetus auratus*) o la ardilla terrestre (*Spermophilus undulatus*) estarían incluidos dentro del primer grupo, con periodos de torpor que pueden durar entre 3 y 4 días, tras los cuales el animal entra en una fase de despertar o *arousal* que dura unas 12-24 horas, y durante la cual recupera su actividad y temperatura (Geiser, 2004, 2013). Estos ciclos torpor-*arousal* se van repitiendo hasta que las condiciones ambientales vuelven a ser favorables para el animal. Es importante mencionar que el significado biológico de la fase de *arousal* aún no se comprende por completo,

pero algunos estudios proponen que pudiera servir como un mecanismo para evitar el deterioro cognitivo (Dave *et al.*, 2012).

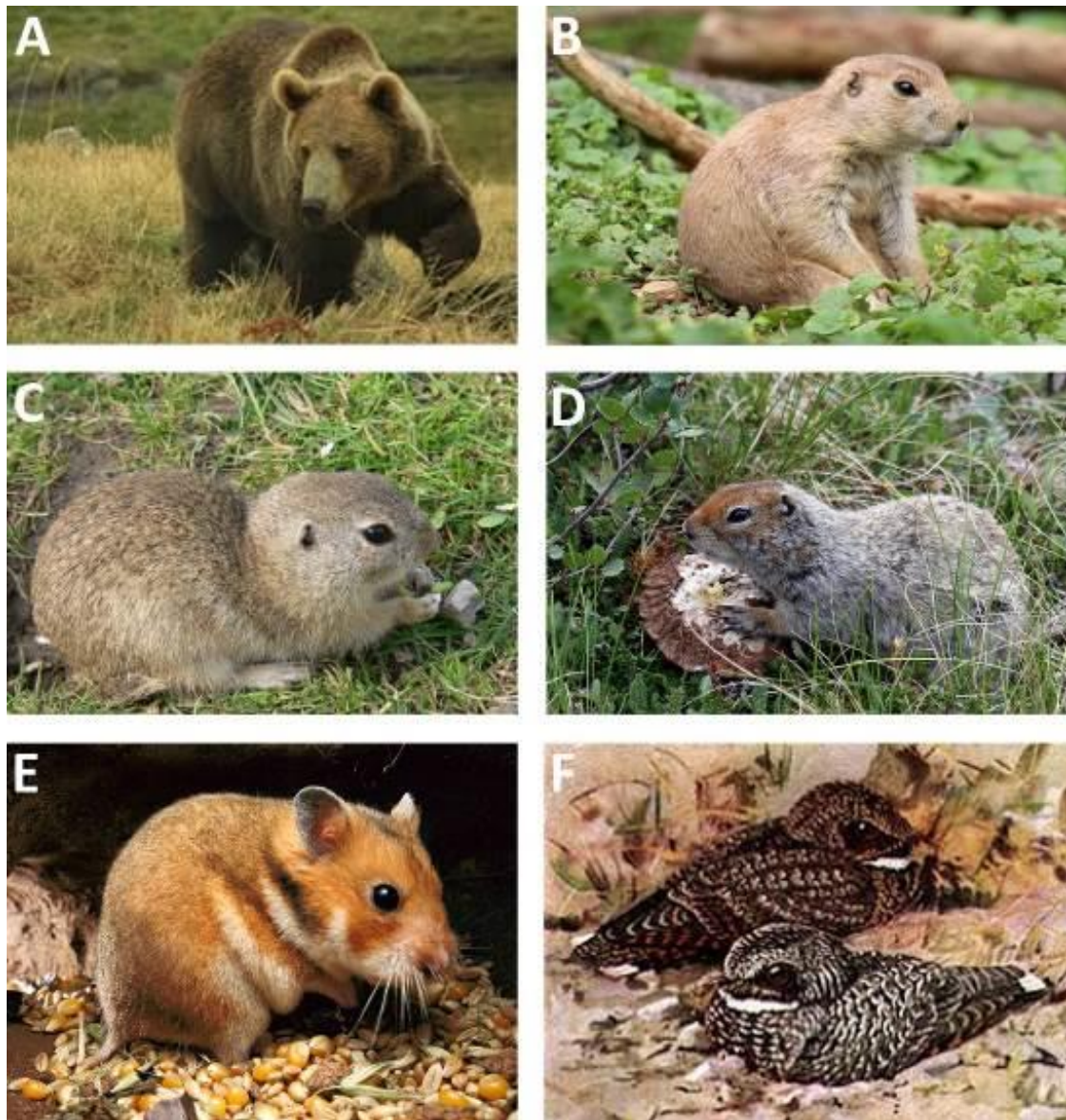


Figura 9| Imágenes de distintos animales que hibernan. (A) Oso grizzly (*Ursus arctos horribilis*), hibernante obligado; (B) Perrito de las praderas (*Cynomys*), hibernante permisivo; (C) Ardilla terrestre (*Spermophilus citellus*), hibernante permisivo; (D) Ardilla terrestre ártica (*Urocyon parryi*), hibernante permisivo; (E) Hámster sirio (*Mesocricetus auratus*), hibernante permisivo; (F) Chotacabras pachagua (*Phalaenoptilus nuttallii*), torpor diurno.

2.4.1.1. Adaptación cerebral durante la hibernación

Durante la hibernación, diversos mecanismos regulan las interacciones entre los sistemas neurales, el metabolismo y la homeostasis. En el cerebro de los animales durante la hibernación, muchas proteínas varían su expresión o sufren

modificaciones, destacando, como se mencionaba anteriormente, la hiperfosforilación de la proteína tau (Arendt *et al.*, 2003). En cuanto a los cambios a nivel de metabolitos, diversos estudios proteómicos y genómicos han demostrado la existencia de cambios de expresión de diversos genes en función de la estación del año. Durante la hibernación de la ardilla terrestre se han descrito cambios en la expresión de proteínas asociadas a la regulación de los microtúbulos, implicadas en la reorganización celular, así como en los niveles de expresión de miARN, sugiriendo que podría haber activos de manera diferencial ciertos mecanismos de modificación postraducciona (Tessier and Wu, 2019).

En cuanto a los efectos de la hibernación sobre la morfología neuronal, las espinas dendríticas y la plasticidad sináptica, en 1992, Popov y sus colaboradores describieron una retracción de los árboles dendríticos (más cortos y con menos ramificaciones) y una reducción en el número de espinas dendríticas en neuronas piramidales del área CA3 del hipocampo de ardillas terrestres europeas (*Spermophilus undulatus*), durante la hibernación empleando la técnica de microscopía electrónica (Popov and Bocharova, 1992). Estos cambios resultaron ser completamente reversibles tras la salida del estado torpor. Más adelante, el mismo grupo realizó otro estudio mediante microscopía electrónica analizando las espinas dendríticas del área CA1 del hipocampo en ardillas terrestres tomadas a baja temperatura (2-4°C) o a temperatura normal (34°C) así como en la rata, un modelo animal no hibernante a baja temperatura (su temperatura corporal era de 15°C) y a temperatura ambiente. Sus resultados indicaron que la hipotermia era capaz de inducir una disminución en el número de espinas finas y un aumento en el número de espinas de mayor tamaño sin encontrar alteraciones en la densidad total de espinas dendríticas, tanto en animales hibernantes como en no hibernantes, siendo el efecto más pronunciado en los primeros (Popov *et al.*, 2007).

Además, estudios realizados en el mismo modelo (ardilla terrestre) por Von der Ohe y sus colaboradores, empleando la técnica de inyecciones intracelulares con la molécula fluorescente *Lucifer Yellow*, demostraron alteraciones en la morfología neuronal durante la hibernación. Las alteraciones consistían en una disminución del tamaño neuronal (área y volumen del árbol dendrítico) y se

describieron en tres áreas distintas del cerebro del roedor: tálamo (neuronas de proyección del núcleo ventral posterior), corteza (células estrelladas de la capa IV del área somatosensorial) e hipocampo (neuronas del área CA3). Además, también mostraron una disminución en la densidad de espinas dendríticas en todas las áreas analizadas durante la fase de torpor. Es importante destacar que dichos cambios se refieren a las ramas de mayor orden, es decir, las más alejadas del soma, en todas las regiones analizadas (Von Der Ohe *et al.*, 2006). Un año más tarde, el mismo grupo publicó un nuevo estudio en el que, empleando técnicas de marcaje inmunohistoquímico y *Western blot*, revelaron que durante la fase de torpor, tienen lugar una serie de cambios en la localización y expresión de diversas proteínas asociadas a las sinapsis, como las proteínas PSD95, Piccolo o sinaptofisina, en diversas áreas del cerebro (hipocampo, tálamo y corteza), atribuyendo los autores dichos cambios a una pérdida del 50-65% de las sinapsis durante esta fase (Von Der Ohe *et al.*, 2007).

Por otra parte, Magariños y sus colaboradores, en un estudio realizado mediante la técnica de tinción de Golgi en el hipocampo del hámster europeo (*Cricetus cricetus*) describieron una pérdida de espinas dendríticas, así como un descenso en la complejidad del árbol dendrítico apical en neuronas del área CA3 del hipocampo. Este estudio además revela que las dendritas basales se mantienen casi inalterables durante la hibernación, así como la densidad de espinas en las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo (Magariños *et al.*, 2006). Un trabajo más reciente realizado en el hámster sirio (*Mesocricetus auratus*) empleando técnicas de marcaje inmunohistoquímico, así como la tinción de Golgi demuestra una reducción transitoria del número de espinas dendríticas en las dendritas apicales, pero no en las dendritas basales de neuronas piramidales de las áreas CA1 y CA3 del hipocampo durante la fase de torpor. Sin embargo, dichas alteraciones no se asocian con pérdida de memoria o capacidades cognitivas (Bullmann *et al.*, 2016)b. Además de los cambios a nivel de morfología neuronal, se han descrito otras alteraciones en el cerebro de los animales durante la hibernación, como demuestra el estudio publicado en 2015 por Antón-Fernández y colaboradores en el que emplean la técnica de *Western blot* así como el marcaje inmunohistoquímico para describir alteraciones en la expresión de proteínas estructurales del aparato de Golgi y una reducción en el volumen y superficie de

los elementos que componen el aparato de Golgi durante las fases de torpor y *arousal* en la hibernación del hámster sirio (Antón-Fernández *et al.*, 2015).

Cabe destacar que la hibernación de pequeños mamíferos es un modelo muy empleado en investigación, ya que permite abarcar un abanico muy amplio de estudios, muchos de ellos centrados en los mecanismos de neuroprotección. El estudio publicado por Zhou y colaboradores en 2001 demuestra que la hibernación protege al cerebro de las respuestas inflamatoria como la microglía activada y del estrés oxidativo (Zhou *et al.*, 2001). Otros estudios se centran en evaluar los efectos de la hipoxia (Ren *et al.*, 2018) o incluso estudios aplicados a inducir la hibernación en humanos con diversos fines, como los viajes al espacio. En concreto, un estudio publicado por Cerri y colaboradores en 2016 demuestra que la hibernación protege al organismo frente a la radiación y que la inducción de un estado de torpor en seres humanos podría ser una herramienta muy útil para la exploración espacial (Mitchell, 1972; Cerri *et al.*, 2016).

3. *Objetivos*

El objetivo principal de la presente tesis doctoral es estudiar, utilizando el modelo del hámster sirio en hibernación, el efecto de la hiperfosforilación de la proteína tau sobre la morfología neuronal de las células piramidales y las posibles alteraciones de la microglía. Este objetivo principal se puede desglosar en tres objetivos concretos:

1. Estudiar el efecto de la hiperfosforilación de la proteína tau sobre la morfología de las dendritas en las neuronas piramidales de la capa Va de la corteza somatosensorial.
2. Analizar el efecto de la hiperfosforilación de la proteína tau sobre la morfología, densidad y distribución de las espinas dendríticas en la dendrita apical principal y de las dendritas basales de las neuronas piramidales de la capa V de la corteza somatosensorial.
3. Estudiar de las alteraciones en la morfología de la microglía en la corteza somatosensorial y en la región CA1 del hipocampo durante la hibernación.

Otros objetivos específicos:

4. Evaluar la hiperfosforilación de la proteína tau en diferentes residuos para establecer una relación con la formación ovillos neurofibrilares y la progresión de la EA en el hipocampo humano.
5. Analizar los cambios metabólicos que tienen lugar durante la hibernación del hámster sirio con el fin de comprender las rutas metabólicas que se activan o se inhiben al entrar en el estado torpor o en la fase de *arousal*.

4. Materiales y métodos

4.1. Material biológico empleado

4.1.1. Hámster sirio

En la presente tesis doctoral se emplea el hámster sirio (*mesocricetus auratus*) como modelo de hibernación (permisivo). Se trata del único roedor común de laboratorio con capacidad para hibernar y cuyo manejo y estabulación es relativamente sencilla. Así pues, el hámster sirio supone, para nuestro laboratorio, el modelo más adecuado para el estudio de los procesos de hiperfosforilación de la proteína tau y sus posibles efectos en la morfología neuronal.

Para provocar de forma artificial la hibernación del hámster sirio es necesario tener en cuenta algunos factores como la oscuridad, la temperatura (que debe descender a unos 4 °C), y el silencio. De entre estos factores, el más determinante es el descenso de la temperatura (Figura 10 A).

El periodo de hibernación del hámster sirio se compone de fases de torpor de unas 48-72 horas de duración y fases de *arousal* o despertar de entre 12 y 24 horas de duración. Durante la fase de torpor, la temperatura corporal del hámster puede descender hasta los 5-7°C sin que esto suponga efectos perjudiciales para su organismo. En estado torpor, su cuerpo permanecerá rígido en una disposición encorvada (*vid.* figura 10A) y su corazón, a pesar de continuar bombeando sangre, disminuye el ritmo a niveles mínimos.

Para el estudio de la morfología neuronal y de las células de microglía, se emplearon 14 hámsteres sirios (*Mesocricetus auratus*) machos de 3 meses de edad adquiridos en Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Francia). De estos 14 animales, 7 se mantuvieron en condiciones de eutermia (grupo control) y a 7 se les indujo la hibernación (grupo torpor). Todos los procedimientos experimentales con dichos animales fueron llevados a cabo en el animalario del Instituto Cajal, CSIC (Madrid), cuyo número de registro es ES 28079 0000184 y todos ellos fueron aprobados por el comité de ética de experimentación animal correspondiente (PROEX 292/15).

Para el estudio metabolómico, que fue desarrollado en colaboración con la Dra. Coral Barbas (CEMBIO (Centre for Metabolomics and Bioanalysis), Facultad de Farmacia, Universidad CEU San Pablo), se emplearon un total de 15 hámsteres sirios (*Mesocricetus auratus*) de 3 meses de edad que fueron adquiridos en Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Francia) y que se dividieron en tres grupos: eutermia, torpor y *arousal*. Los primeros se mantuvieron en condiciones de eutermia, y a los dos segundos se les indujo la hibernación, sacrificándose los del grupo torpor en fase de torpor y los del grupo *arousal* en fase de *arousal*. Todos los procedimientos experimentales en animales fueron llevados a cabo en el animalario de la Universidad San Pablo CEU, cuyo número de registro es ES 28022 0000015, y aprobados por el comité de ética correspondiente (PROEX 74/14).

Con el fin de inducir la hibernación, los animales se colocaron en jaulas independientes con el enriquecimiento ambiental adecuado para permitir, por ejemplo, la construcción de nidos que el roedor emplea a modo de refugio (Figura 10B).

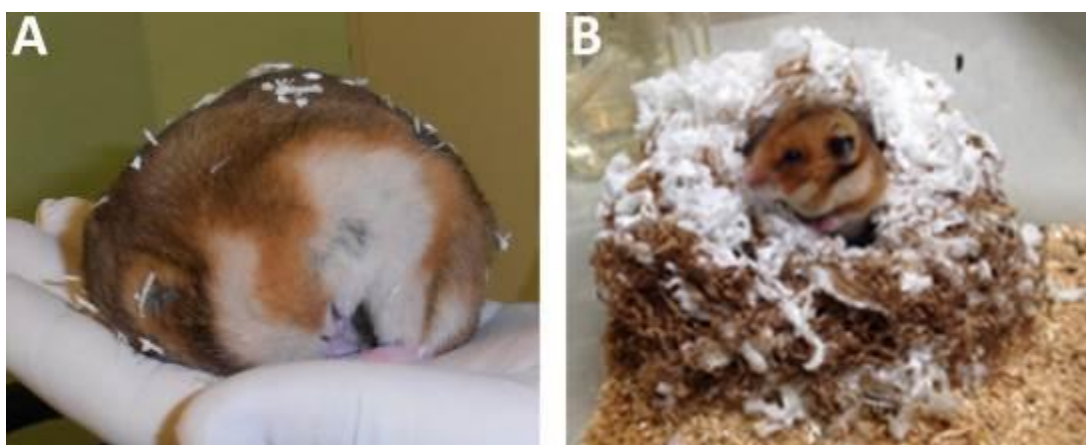


Figura 10| Imágenes del hámster sirio en fase de torpor (A) y en fase de *arousal* (B), donde también se observa el nido que construyen como refugio.

Durante el periodo de aclimatación, que suele tener una duración de entre 4 y 6 semanas, los animales se mantuvieron a una temperatura media de 23°C, con acceso libre a comida y agua y un ciclo luz: oscuridad de 8:16 horas. Con el fin de obtener el grupo en fase de torpor, 6 de los animales se transfirieron a una nevera especialmente diseñada para inducir la hibernación. Esta nevera permite llevar a cabo una reducción gradual de la temperatura, regular la iluminación (a través de dispositivos LED RGB (del inglés, *Light Emitting Diode* o diodo emisor de luz RGB)

y monitorizar a los hámsteres midiendo su actividad locomotora con sensores infrarrojos pasivos montados sobre cada una de las jaulas (Figura 11 A). Además, todos los datos registrados se almacenaron en un ordenador equipado con el software Fastwinter 1.9 (desarrollado por Tiselius s.l.; www.tiselius.es), que permite discernir entre las fases torpor y *arousal*, así como predecir de forma aproximada cuándo el animal va a entrar en cada fase (Figura 11 B). Para favorecer el bienestar animal, la disminución de luminosidad y de temperatura se realizó de forma gradual; de este modo, transcurrió una semana hasta alcanzar oscuridad total y una temperatura de 4°C que permita a los animales entrar en hibernación. El proceso de entrada en hibernación es lento y tarda unos 2-3 meses. Se considera que un animal ha entrado en torpor cuando se detectan periodos de inactividad de al menos 24 horas.

Dado que, al comienzo de la hibernación, la alternancia entre las fases de torpor y *arousal* no es estable, el sacrificio de los animales se realizará siempre tras completar al menos 3 ciclos torpor/*arousal*, a las 36-48 horas desde la entrada en torpor puesto que se ha descrito que es durante este intervalo de tiempo cuando se muestran mayores niveles de hiperfosforilación de la proteína tau (Arendt *et al.*, 2003; Bullmann *et al.*, 2016).

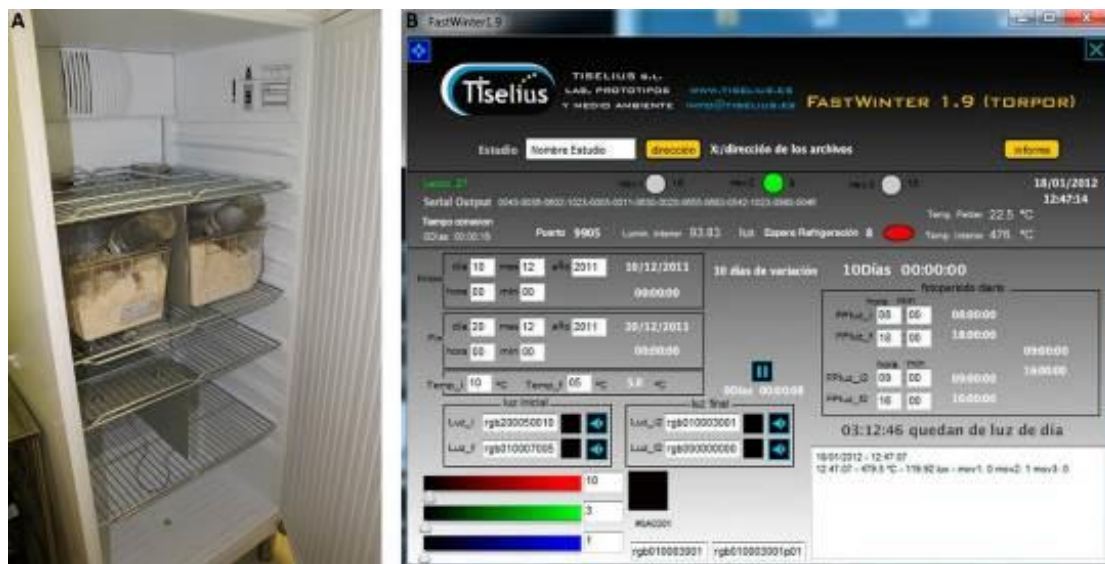


Figura 11| Hibernación del hámster sirio. (A) Nevera especialmente diseñada para la inducción de la hibernación con espacio para 6 jaulas individuales (B) Captura de pantalla del software Fastwinter 1.9 (Tiselius s.l.).

4.1.2. Humano

Las muestras de tejido humano fueron obtenidas de dos fuentes diferentes: Banco de Tejidos Neurológicos del Hospital Universitario Clínico de Barcelona (Dr. I. Ferrer, *Servicio de Anatomía Patológica*, IBIDELL - Hospital Universitario de Bellvitge, Barcelona, España) y el Banco de Tejidos Fundación CIEN (Dr. A. Rábano, Área de Neuropatología, Centro Alzheimer, Fundación Reina Sofía, Madrid, España). Para cada individuo, se obtuvieron los datos clínicos y otras variables pertinentes (Tabla 1). Además, cabe resaltar la importancia del tiempo tras la muerte del individuo (tiempo *postmortem*) al que se lleva a cabo la extracción y procesamiento del cerebro en la calidad del tejido, siendo esta mucho mejor en aquellos cerebros extraídos a tiempos *postmortem* bajos. En los estudios incluidos en esta tesis doctoral se han empleado casos con tiempos *postmortem* siempre menores de 6 horas. La Tabla 1 detalla la información técnica y patológica de los casos utilizados.

4.2. Procesamiento del tejido

4.2.1. Hámster sirio

Los animales fueron sacrificados mediante una inyección intraperitoneal letal de pentobarbital sódico (200 mg/kg) y después perfundidos intracardialmente con una solución salina seguida de paraformaldehído (PFA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) al 4% en tampón fosfato (PB por sus siglas en inglés *phosphate buffer*, 0,1M; pH 7,4). El cerebro de cada animal fue extraído y post fijado durante 24 horas en la misma solución fijadora a 4°C.

4.2.2. Humano

Una vez extraídos, los cerebros se cortaron en rodajas coronales para facilitar su fijación por inmersión en una solución de PFA al 4% en PB 0,1M, pH7,4 a 4°C. Posteriormente, las rodajas se dividieron en pequeños bloques de un tamaño aproximado de 6 cm³. Dichos bloques fueron de nuevo incubados en la misma solución fijadora a 4°C durante 24 horas más.

Para ambas especies, tras la fijación, parte del tejido se empleó para realizar técnicas de inyección intracelular, para lo cual se cortó en secciones de 300 µm en

el caso del humano y 200 μ m en el caso del hámster sirio de grosor mediante el uso de un vibrátomo (StLouis, MO, EE. UU.), y se almacenó en tampón fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés *phosphate-buffered saline*) 0,1M, pH 7,4 a 4°C. Por otro lado, parte del tejido se lavó con PB 0,1M y se llevó a cabo una crioprotección por inmersión en una solución de sacarosa al 30% durante al menos 24 horas. Una vez finalizada, se procedió a congelar las muestras a -20°C para su preservación para posteriores experimentos.

Tabla 1| Información clínica y patológica de los 21 casos humanos utilizados para este estudio. Utilizamos un código interno para nombrar a cada paciente de forma que se asegure la confidencialidad para cada muestra. DCL: demencia por cuerpos de Lewy; EH: esclerosis hipocampal; Syn: sinucleína; -: no disponible.

Casos	Edad (años)	Género	Tiempo postmortem (h:min)	Estadio Braak	Estadio CERAD	Evidencia de deterioro cognitivo o demencia	Diagnóstico neurológico adicional
IF9	72	Hombre	3:30	I	Ninguno	NO	Encefalopatía multi-infarto. Demencia con granos argirofílicos estadio II.
VK2	87	Hombre	4	II	A	SI	Enfermedad de vasos pequeños. Isquemia aguda y anoxia global con infarto en hipocampo izquierdo.
IF8	91	Hombre	2:30	III	A	NO	Demencia con granos argirofílicos estadio II, células baloniformes.
VK21	78	Mujer	3:30	III	Ninguno	SI	Alteraciones vasculares.
BCN11	94	Mujer	5:45	III	Ninguno	SI	Parkinson asociado.
BCN15	64	Mujer	3	III	Ninguno	SI	DCL; Enfermedad de vasos pequeños.
AB5	59	Hombre	4	III	Ninguno	NO	-
AB6	92	Mujer	4	III	A	NO	Astroglipatía de tau asociada a la edad.
BCN4	87	Mujer	5:30	IV	B	SI	TDP43; EH.
BCN2	82	Mujer	2	V	C	SI	α Syn (amígdala); EH.
BCN6	76	Mujer	5	V	C	SI	TDP43 (sist. límbico); EHL.
BCN10	80	Mujer	5	V	C	SI	Meningioma
VK15	86	Hombre	2:30	V	C	SI	Alteraciones vasculares; EH.
VK27	95	Mujer	4	V	B	SI	DCL (amígdala)
VK28	86	Mujer	5:30	V	C	SI	DCL (sist. límbico); TDP43 (hipocampo)
BCN1	90	Hombre	4:30	VI	C	SI	Microinfartos.
BCN7	89	Mujer	4:15	VI	C	SI	TDP43 (amígdala)
BCN9	84	Mujer	5	VI	C	SI	TDP43 (sist. límbico)
BCN12	74	Mujer	3:30	VI	C	SI	Enfermedad de vasos pequeños.
BCN13	83	Hombre	2:30	VI	C	SI	Encefalopatía vascular; DCL (amígdala).
VK16	88	Mujer	2	VI	C	SI	Alteraciones vasculares; DCL; EH.

4.3. Inyecciones intracelulares

La técnica de inyecciones intracelulares se emplea para analizar la morfología celular, y consiste en introducir, en el interior de las células de interés, una molécula fluorescente con el fin de que difunda por todos los compartimentos subcelulares (soma, dendritas y axón) hasta llenarla en su totalidad o, al menos, en la mayor medida posible. Para las inyecciones intracelulares llevadas a cabo en la presente tesis doctoral, se utilizó la molécula fluorescente *Lucifer Yellow* (LY) al 8 % en tampón Tris 0.1M, pH 7.4.

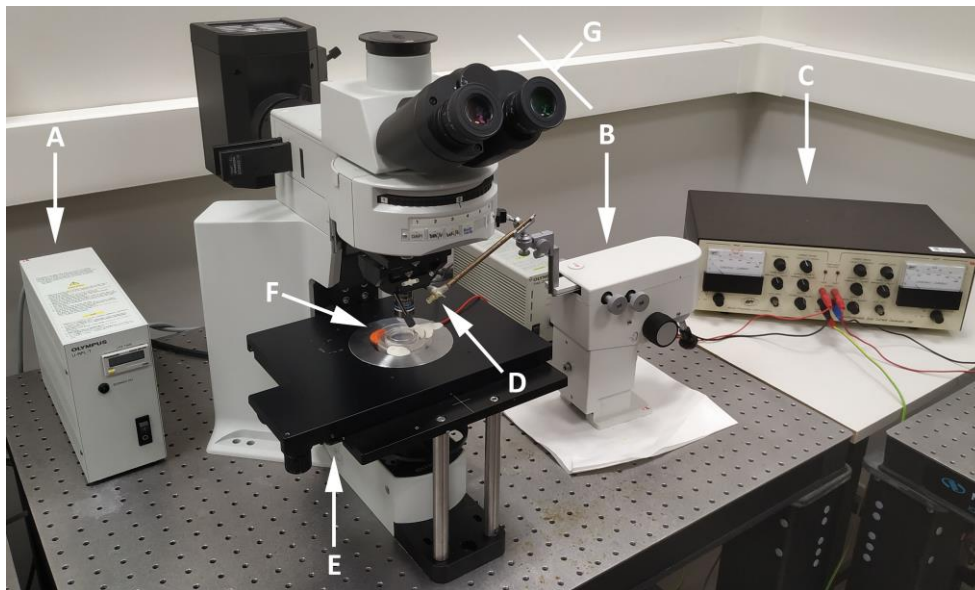


Figura 12| Fotografía del sistema de inyecciones intracelulares en la que se distinguen todas sus partes: lámpara de fluorescencia (A), microscopio de fluorescencia directa (G) equipado con un pocillo para las inyecciones (F) colocado sobre la pletina del microscopio (E) y un micromanipulador (B) con un brazo para colocar el electrodo de inyecciones (D) y el generador de corriente dual (C).

Esta técnica se lleva a cabo en microscopios de fluorescencia directos (BX51WI, Olympus, Hamburgo, Alemania) modificados especialmente mediante la colocación, sobre la pletina, de una placa petri de 35 mm adaptada en cuyo interior se coloca la sección de tejido que se desea inyectar. Esta sección ha sido previamente teñida con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.) por inmersión durante 30 segundos para visualizar los núcleos de las células que se desean inyectar. A continuación, las secciones teñidas se colocan entre dos filtros o membranas de ésteres de celulosa mixtos (Merck Millipore, Irlanda), con el fin de evitar que se mueva durante las inyecciones. Además del

microscopio modificado, cada equipo de inyecciones intracelulares cuenta con un micromanipulador (Leika Microsystems, Wetzlar, Alemania) el cual permite mover de forma muy precisa el electrodo de vidrio (1 mm x 0,58 mm, 4"; A-M Systems; Sequim, WA, EE. UU.) con el que vamos a llevar a cabo las inyecciones. Este electrodo se rellena con LY y se inserta en el brazo del micromanipulador. Tanto el pocillo circular del microscopio como el brazo del micromanipulador se encuentran sumergidos en soluciones óptimas para la conductividad eléctrica (PBS y cloruro de litio respectivamente) y ambos se encuentran conectados a un generador de corriente dual (*World Precision Instruments*; Sarasota, FL, EE. UU.). De esta manera, cuando el electrodo entra en contacto con la célula que se desea inyectar (en el interior del pocillo del microscopio), se cierra el circuito eléctrico de corriente continua, permitiendo que el LY fluya hacia el interior de la célula (Figura 12).

El LY se aplicó a cada una de las células hasta que las partes más distales de la misma mostraron una fluorescencia intensa, equiparable a la de las zonas más proximales. El tiempo de llenado varía según el tamaño de la célula y la calidad de la fijación del tejido, entre otros factores. En el caso del hámster sirio, cada neurona se llenó en aproximadamente 10 minutos, mientras que en el humano el tiempo de llenado por célula fue prácticamente el doble.

En el caso del hámster sirio, se llevaron a cabo inyecciones intracelulares en neuronas piramidales de capa V, específicamente las de la capa Va, del área somatosensorial primaria del hemisferio derecho, y en células de microglía pertenecientes a la capa V de la corteza somatosensorial primaria y al *stratum radiatum* del área CA1 del hipocampo. Con el fin de garantizar la mayor calidad en las inyecciones intracelulares, éstas se llevaron a cabo siguiendo el protocolo detallado más arriba durante los 3-5 días posteriores a la fijación y el corte de las secciones. Pasado ese tiempo, en base a la experiencia de nuestro laboratorio, consideramos que el tejido comienza a perder consistencia, pudiendo darse alteraciones en la morfología neuronal que pudieran afectar a nuestros resultados, por lo que pasados 5 días no se prosigue con las inyecciones. Además, cabe destacar que, debido al pequeño tamaño del cerebro del hámster, ese tiempo es suficiente para obtener un elevado número de células inyectadas.

En el tejido humano, las inyecciones intracelulares se llevaron a cabo en neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo. En el caso del cerebro humano, debido a su tamaño, no es posible inyectar el número deseado de células en los 5 primeros días tras su fijación. Por ello, pasado este tiempo, se procedió a la postfijación de las secciones utilizando PFA al 4% y glutaraldehído al 0,125 % en PB 0,1M pH 7,4 durante 1 hora con el fin de garantizar la integridad del tejido. Una vez postfijados y se almacenaron en PBS con azida sódica (Merck, Darmstadt, Alemania) al 0,01% a 4°C para evitar la posible contaminación con microorganismos. Tras esto se continuaron las inyecciones intracelulares con el mismo método descrito anteriormente hasta finalizar las inyecciones en todas las secciones de interés. En función de la calidad del tejido, esta segunda fase de inyecciones intracelulares suele durar alrededor de 1-2 meses.

4.4. *Inmunohistoquímica*

Las técnicas de inmunohistoquímica tienen como finalidad la visualización o detección de antígenos específicos en el tejido de estudio. Esto se logra mediante el uso de anticuerpos específicamente diseñados para su unión a dichos antígenos. Concretamente, los anticuerpos se unen a uno de los epítopos (porción de una macromolécula que es detectada por un anticuerpo) del antígeno diana. Esto hace posible, por ejemplo, la detección, mediante el uso de varios anticuerpos, de modificaciones diferentes de la misma proteína.

De forma general, el marcaje inmunohistoquímico se logra gracias a la incubación de la muestra junto con uno o varios anticuerpos primarios, su posterior lavado y su incubación con el o los anticuerpos secundarios correspondientes a la especie utilizada para los primarios. La concentración, así como los tiempos de incubación dependerán del anticuerpo, la muestra y el experimento (Detallado en Tabla 2).

Cabe destacar que, en los dobles o triples marcajes inmunohistoquímicos, la intensidad de la señal del marcaje no es igual para todos los anticuerpos utilizados, dependiendo de diversos factores como la afinidad del anticuerpo primario por la proteína diana, su eficiencia a la hora de unirse a la misma, su capacidad de penetración en el tejido o la cantidad de proteína disponible para la unión. Por ello,

en los marcajes dobles, se lleva a cabo la amplificación, mediante el sistema biotina - estreptavidina de aquel anticuerpo con menor intensidad de señal. En el caso del hámster, la intensidad de señal del anticuerpo AT8 es menor que la de LY, por lo que se ha preferido amplificar AT8 para poder distinguir con mayor claridad las células AT8 positivas. Sin embargo, en el tejido humano, dado que la proteína tau hiperfosforilada se agrega de forma abundante no es necesaria su amplificación y, por tanto, se ha amplificado el LY en su lugar.

Puesto que la fijación del tejido podría afectar a las propiedades bioquímicas de las proteínas de forma que el antígeno de interés podría verse enmascarado, se llevó a cabo un protocolo de rescate de antígenos antes de la inmunotinción para confirmar que los epítomos de interés se estaban reconociendo en su totalidad por los anticuerpos primarios utilizados. Para esto, algunas secciones fueron incubadas en tampón de citrato sódico 10mM y pH 8,5 durante 30 minutos a 80°C antes de la incubación en H₂O₂ al 2%.

Una vez marcadas, las secciones se lavaron con PB 0,1M y se montaron utilizando *ProLong Gold* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE. UU.) como medio de montaje y se almacenaron a -20°C.

4.4.1. Revelado con DAB

Para llevar a cabo la técnica de tinción con 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorido (DAB; Sigma-Aldrich), tanto en humano como en hámster, se tomaron secciones de 50 µm de grosor y se trataron con una solución de H₂O₂ al 1,66% durante 30 minutos para eliminar la actividad de las peroxidasas endógenas del tejido que podrían oxidar el DAB y generar fondo en las muestras. Posteriormente, fueron incubadas durante 1 hora una solución de suero normal del animal en el que esté hecho el anticuerpo biotinilado que se vaya a utilizar posteriormente (Detallado en tabla 2) al 3% y Triton-X (Merck, Darmstadt, Alemania) al 0,25%. Una vez realizado este pretratamiento, las secciones se incubaron durante 12 horas en anticuerpo primario a 4°C y después lavadas con PB 0,1M. Una vez lavadas, las secciones se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo biotinilado específico para la detección de anticuerpos hechos en la especie del anticuerpo primario utilizado. Tras esto se incubaron

durante 1 hora en una solución con un complejo peroxidasa avidina-biotina (Vectastain ABC Elite PK6100, Vector) y tratadas con DAB (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, EE. UU.). Una vez teñidas, las muestras se deshidrataron y aclararon con xileno y se montaron utilizando DPX (Merck, Darmstadt, Alemania) como medio de montaje.

Tabla 2 | Información detallada sobre los anticuerpos utilizados en la presente tesis doctoral.

	Anticuerpo	Epítipo que reconoce	Especie en la que se hizo	Especie que reconoce (opcional)	Dilución	Marca comercial
PRIMARIOS	Tau AT8	p-S202 p-T205	ratón	NA	1:2000	Pierce Endogen
	Tau AT100	p-T212 p-S214	ratón	NA	1:500	Thermo Fischer
	Tau pS396	P-396	conejo	NA	1:2000	Invitrogen
	LY	LY	conejo	NA	1:400000	Instituto Cajal
	Iba-1	Iba-1	cabra	NA	1:500	ABCCAM
	a β	a β	ratón	NA	1:50	Dako
	TDP43	p-409/410 TDP43	conejo	NA	1:500	Proteintech
SECUNDARIOS	IgGBiotinizado	NA	cabra	ratón	1:200	Vector
	IgGBiotinizado	NA	caballo	ratón	1:200	Vector
	AlexaFluor 488	NA	cabra	ratón	1:1000	Invitrogen/Mol. Probes
	AlexaFluor 488	NA	cabra	conejo	1:1000	Invitrogen/Mol. Probes
	AlexaFluor 594	NA	cabra	ratón	1:1000	Invitrogen/Mol. Probes
	Estreptavidina-AlexaFluor 488	Biotina	NA	NA	1:1000	Invitrogen/Mol. Probes
	Estreptavidina-AlexaFluor 594	Biotina	NA	NA	1:1000	Invitrogen/Mol. Probes

4.5. Microscopía confocal

Todas las muestras se escanearon utilizando un microscopio confocal *Zeiss LSM 710 confocal laser scanning system 205* (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Alemania). Brevemente, el microscopio confocal nos permite la adquisición de pilas o series de imágenes en profundidad, generando una imagen final tridimensional que puede ser reconstruida en softwares especialmente diseñados para dicho fin.

El tamaño de *voxel* (del inglés *volumetric pixel*; unidad cúbica que compone un objeto tridimensional), así como el tamaño de imagen fueron distintos en función del experimento.

Para las imágenes tridimensionales de células completas se tomaron mosaicos compuestos de imágenes seriadas con un solapamiento del 10% utilizando el objetivo 63x de inmersión en glicerol y siendo el tamaño de *voxel* de 0,11 x 0,11 x 0,35 μm en el hámster sirio y 0,24 x 0,24 x 0,29 en el humano. El tamaño (tanto en área como en volumen) de las imágenes varía en función del tamaño y profundidad de la célula en la sección, siempre asegurando la captura de todas las dendritas basales y colaterales de la dendrita apical. La intensidad del láser se ajustó en cada célula de forma que las ramas más distales fueran claramente visibles y evitando en la medida de lo posible la saturación en las ramas proximales.

En el caso de las regiones de la dendrita apical principal para reconstruir las espinas dendríticas se tomaron series de imágenes consecutivas con un espaciado en z de 0,14 μm , utilizando el objetivo 63x de inmersión en aceite, asegurando incluir todas las espinas dendríticas de la dendrita apical fotografiada. El tamaño de *voxel* en estas imágenes fue de 0,06 x 0,06 x 0,14 μm . La intensidad del láser para el canal 488 se ajustó en cada dendrita asegurando que todas las espinas dendríticas fueran claramente visibles sin llegar a saturar ninguna de ellas, con independencia de saturar ligeramente el tronco de la dendrita.

Para el estudio de los patrones de hiperfosforilación de la proteína tau en humano se tomaron series de imágenes consecutivas empleando bien el objetivo 63x de inmersión en aceite, con un tamaño de *voxel* de 0,13 x 0,13 x 0,35 μm o bien con el objetivo 40x de inmersión en aceite, con un tamaño de *voxel* de 0,21 x 0,21 x 0,5 μm . La profundidad de la pila de imágenes fue de unas 40 μm en todos los casos. Se escanearon al menos 6 imágenes del grosor indicado de la región de CA1 de cada una de las secciones incluidas en el estudio (al menos una sección por cada caso).

Cabe destacar que la elección entre el uso del objetivo 63x de inmersión en aceite o glicerol se lleva a cabo en función del fin que se persiga con la adquisición

de las imágenes. Brevemente, el objetivo de glicerol tiene una apertura numérica de 1,3 mientras que el de aceite tiene una apertura numérica de 1,4. Esto hace que el de objetivo de aceite permita obtener una mejor definición mientras que el de glicerol, a costa de perder cierta definición, permite penetrar más en el tejido. Además, en cuanto al medio de inmersión, el aceite tiene un índice de refracción similar al cubreobjetos, haciéndolo óptimo para las adquisiciones de imágenes poco profundas. Por otro lado, el glicerol tiene un índice de refracción más similar al del interior del portaobjetos, donde está el tejido con el medio de montaje, haciéndolo óptimo para las capturas más profundas.

4.6. *Reconstrucción morfológica*

Las reconstrucciones morfológicas, así como los contajes y la extracción de los datos se llevaron a cabo utilizando dos softwares distintos, elegidos según el tipo de análisis: Neurolucida (*Micro-BrightField*, Williston, EE. UU.) e Imaris 7.6.4 (*Bitplane AG*, Zurich, Suiza).

4.6.1. *Neurolucida*

El software Neurolucida permite llevar a cabo una reconstrucción tridimensional de las neuronas de forma semiautomática, detectando el soma, la dendrita apical, las dendritas basales y el axón por separado (Figura 13). De manera resumida, las dendritas, el soma y el axón de las células se describen como un esqueleto de puntos, delimitando los diferentes segmentos del árbol dendrítico. Estos puntos tienen un valor de diámetro asociado que aporta información sobre las variaciones en el grosor de las dendritas de la neurona y de cómo varía a lo largo de la dendrita. Además, Neurolucida permite la reconstrucción de espinas dendríticas tanto en 3D, de manera similar a las reconstrucciones de la célula completa, como en 2D, permitiendo el avance del usuario por cada uno de los planos de la serie de imágenes adquirida en el microscopio confocal de forma que se permite la reconstrucción del tronco de la dendrita, así como de las espinas dendríticas de forma manual, obteniendo únicamente valores de densidad y distribución de las espinas dendríticas sobre la dendrita analizada pero no su morfología tridimensional. Diversas variables morfológicas se extrajeron utilizando este software y se analizaron en forma de valores totales medios y en

base a su distribución en función de la distancia al soma. Este último análisis recibe el nombre de análisis de Sholl y se basa en una serie de círculos concéntricos cuyo centro se sitúa en el soma y cuyo radio va aumentando en un número de μm determinado (10 μm en nuestro estudio). De esta forma, se puede analizar la variación de cada variable cada 10 μm con respecto al soma, así como los valores medios totales de dichas variables para cada árbol dendrítico. Las variables analizadas se dividen en dos grupos: variables que miden la complejidad celular, dentro de las cuales encontramos el número de intersecciones (número de ramas que cruzan uno de los círculos concéntricos del análisis de Sholl), número de nodos, número de terminaciones, diámetro dendrítico y las variables que expresan morfología celular, encontrando en este grupo la longitud, el área y el volumen dendríticos. Además, se analizó el número de dendritas basales y la distancia a la que emergen las dendritas colaterales de la dendrita apical principal, así como la distancia con respecto al soma a la que empiezan a aparecer las espinas dendríticas tanto en la dendrita apical principal como en las dendritas basales.

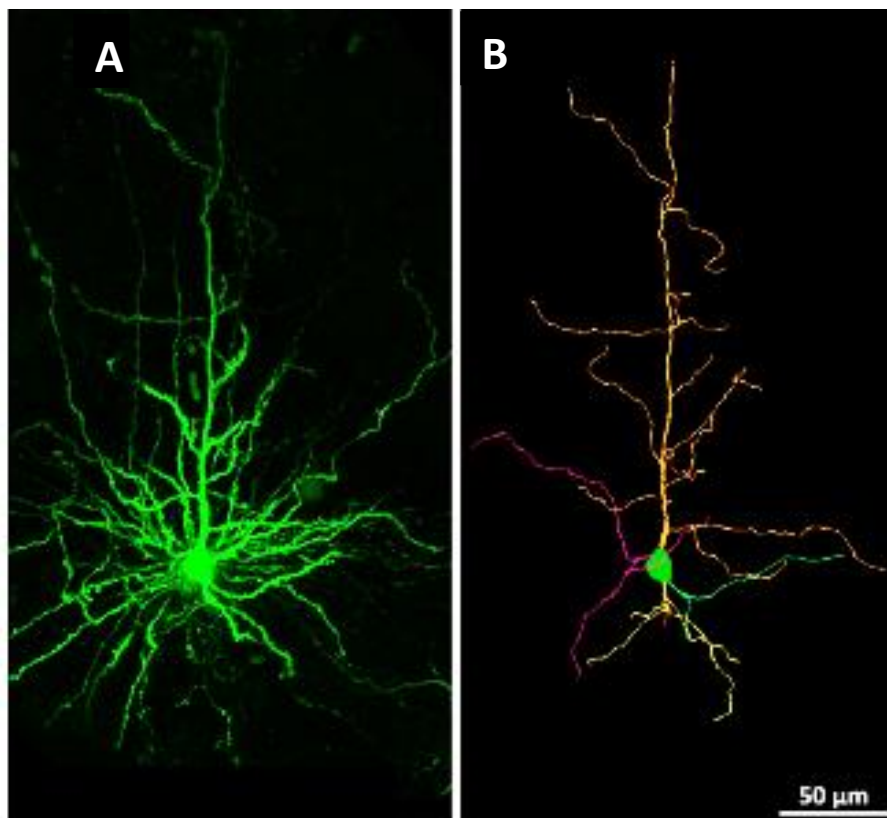


Figura 13| (A) Imagen de una neurona piramidal de capa V del hámster inyectada con LY adquirida mediante el microscopio confocal. (B) Reconstrucción tridimensional de la neurona mostrada en A realizado mediante el software Neurolucida 360.

Es importante destacar que, debido al método de las inyecciones intracelulares, no es posible analizar las células completas, sino que siempre se pierden algunas dendritas, especialmente en el árbol apical, ya sea porque no se han llenado completamente o porque se cortan debido a la inclinación con la que se ha seccionado el tejido. Por ello, para el análisis de morfología neuronal, se acotaron los valores analizados en base al análisis de Sholl, analizando, en el caso de las dendritas apicales, los primeros 180 μm desde el soma. Las dendritas basales se analizaron sin llevar a cabo acotaciones con respecto al análisis de Sholl, incluyendo, tanto para las dendritas apicales como para las basales, para los análisis de segmentos, únicamente aquellos con terminación completa (Figura 14).

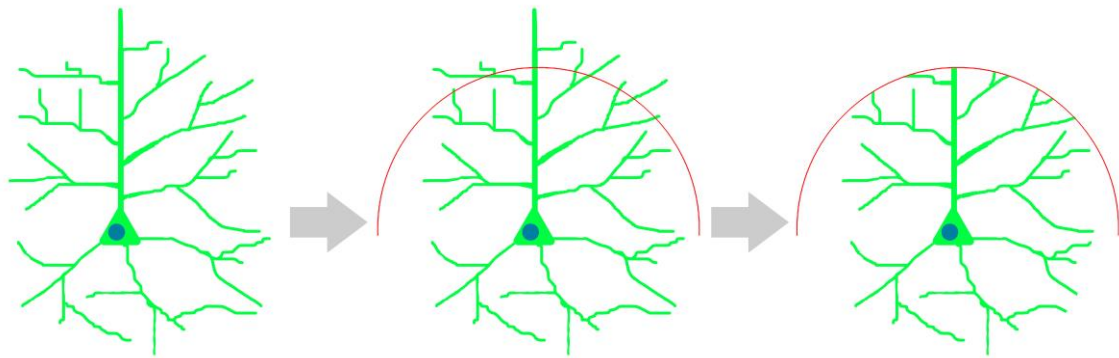


Figura 14| Representación esquemática del procedimiento que se ha seguido para acotar el rango de árbol dendrítico apical analizado a 180 μm desde el soma.

Por otro lado, mediante el uso del software Neurolucida, se puede llevar a cabo un análisis por segmentos. Se considera un “segmento” a una porción de dendrita (ya sea de la dendrita apical o de la basal) con un comienzo y un final. Podemos encontrar diversos tipos de segmentos: porciones de dendrita que comiencen en el soma y terminen en un nodo, porciones de dendrita que comiencen en el soma y terminen en una terminación (ya sea normal o incompleta), porciones de dendrita que comiencen en un nodo y terminen en otro nodo y porciones de dendrita que comiencen en un nodo y terminen en una terminación. Estos segmentos se engloban dentro de dos categorías: segmentos terminales, a saber, todos aquellos segmentos que acaban en una terminación; y segmentos que ramifican, es decir, todos aquellos segmentos que terminan en un nodo. Cabe destacar que, para los estudios descritos en esta tesis, se han seleccionado únicamente aquellos segmentos terminales que denominamos

segmentos terminales normales o completos. Estos segmentos terminales se determinan en base a una serie de criterios: que la terminación se encuentre en la zona media de la serie de imágenes del confocal, que veamos con claridad las últimas espinas de dicha rama o que no veamos pérdida de intensidad en el marcaje de la terminación. Además, los segmentos analizados se han organizado en función del orden de ramificación. Brevemente, los segmentos de orden de ramificación 1 son aquellas que nacen en el soma y luego dan lugar a un nodo (bifurcación) o a una terminación; los segmentos de orden 2 son aquellos que surgen de un nodo perteneciente a una rama de orden 1; los segmentos de orden 3 son aquellos que surgen de un nodo perteneciente a una rama de orden 2 y así sucesivamente (Figura 15).

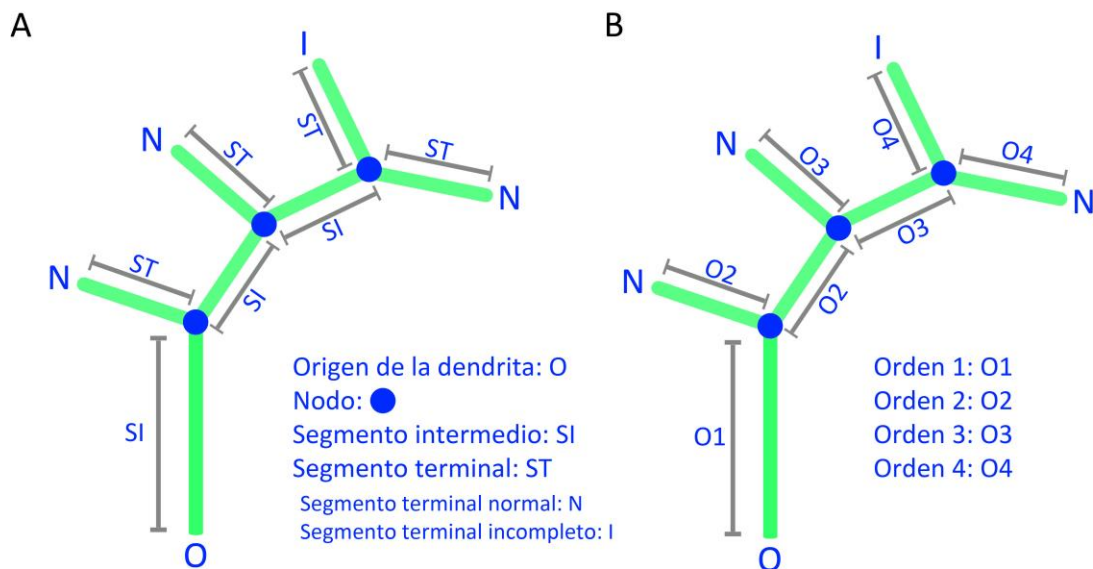


Figura 15| Representación esquemática que ilustra los tipos de segmentos de las dendritas: segmentos que ramifican y segmentos terminales (A) así como los órdenes de ramificación de estos (B).

Además, la herramienta en 2D de Neurolucida permite medidas del número objetos por área ya que permite dibujar el contorno de la región analizada y marcar, mediante el uso de marcadores, cada uno de los objetos de interés. Esta herramienta se ha utilizado, por ejemplo, en el conteo de placas A β en el área de CA1 (mm²).

Todos los datos obtenidos mediante el software Neurolucida fueron extraídos utilizando una herramienta del software Neurolucida especialmente

diseñada para la extracción de los datos pertenecientes a las reconstrucciones llamada Neurolucida Explorer y algunos de ellos se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3| Descripción de los tipos de análisis llevados a cabo con respecto a las reconstrucciones tridimensionales de los árboles dendríticos, así como las principales variables analizadas.

Tipo de análisis	Descripción	Tipo de variables	Variable	Qué mide/Cómo se mide
Media de los valores totales	Promedio de la suma de los valores para cada variable en cada célula.	De complejidad	Tortuosidad (únicamente en análisis por segmentos)	Propiedad de tener muchas curvas. Se calcula evaluando cuánto y cuántas veces se desvía la dendrita de una línea recta imaginaria que pasaría por su eje central.
			Diámetro medio	Media del diámetro en cada punto de la dendrita analizada.
			Número de nodos	Número total de nodos hallados en las dendritas analizadas.
			Número de intersecciones	Número total de intersecciones a los círculos concéntricos del análisis de Sholl hallados en las dendritas analizadas.
			Número de terminaciones	Número total de terminaciones hallados en las dendritas analizadas.
		Morfológicas	Longitud	Para cada célula, la suma de todos los tramos de la dendrita analizada sumados de manera lineal.
			Área	Para cada célula, la suma de la longitud de todos los tramos de la dendrita analizada multiplicada por el diámetro en cada punto.
			Volumen	Para cada célula, la suma del área de todos los tramos de la dendrita analizada multiplicada por el diámetro en cada punto.
Análisis Sholl	Variación de cada variable cada 10 μm con respecto al soma. Para su cálculo, se establece el soma como centro de la célula y se trazan círculos concéntricos cada 10 μm desde dicho punto.	De complejidad	Diámetro medio	Media del diámetro en cada punto de la dendrita analizada en cada tramo de 10 μm con respecto al soma.
			Número de nodos	Media del número total de nodos hallados en las dendritas analizadas en cada tramo de 10 μm con respecto al soma.
			Número de intersecciones	Media del número total de veces que la dendrita analizada cruza con cada uno de los círculos concéntricos del análisis de Sholl.
			Número de terminaciones	Media del número total de terminaciones halladas en las dendritas analizadas en cada tramo de 10 μm con respecto al soma.
		Morfológicas	Longitud	Media de la longitud dendrítica en cada tramo de 10 μm con respecto al soma.
			Área	Media del área dendrítica en cada tramo de 10 μm con respecto al soma.
			Volumen	Media del volumen dendrítico en cada tramo de 10 μm con respecto al soma.

4.6.2. *Imaris*

El software Imaris ofrece un amplio abanico de posibilidades en cuanto a la reconstrucción tridimensional de células y estructuras celulares, así como al análisis de patrones de marcaje inmunohistoquímico o conteo de estructuras o células marcadas (Figura 16).

Así pues, su herramienta *Filament Tracer* permite la reconstrucción de las dendritas con sus espinas dendríticas gracias a que está especialmente diseñada para la reconstrucción de estas. Esta herramienta permite establecer un punto de origen de la dendrita y reconstruirla, es decir, generar mallas tridimensionales a partir de las imágenes de microscopía confocal, de forma semiautomática. El programa detecta el eje de la dendrita y las espinas dendríticas de la misma como elementos diferenciados, permitiendo su ajuste o modificación por parte del usuario. Además, el propio programa genera una hoja de cálculo incluyendo todos los parámetros morfológicos deseados, de entre los que se han analizado: volumen de las espinas, área de las espinas y longitud de las espinas. La densidad de espinas fue calculada en función del número de espinas reconstruidas por cada 10 μm de longitud de la dendrita.

Por otro lado, su herramienta *Surface* permite la creación superficies (mallas tridimensionales) que corresponden con la superficie de la estructura que se quiera analizar, ya sean somas neuronales, espinas dendríticas o células enteras, como las células de microglía, identificándolas en base a su inmunoreactividad para el marcador con el que se haya marcado. El rango de luminosidad que el programa utiliza para crear dichas superficies es elegido por el usuario, de forma que se pueda adaptar al contorno del objeto a analizar. Así, para la reconstrucción de las células de microglía, para cada serie de imágenes adquirida con el microscopio confocal se generó una superficie tridimensional basada en el marcaje de LY (verde) basada en una única célula de microglía inyectada y que cubriese todos sus prolongaciones. Esta superficie, que encaja a la perfección con el contorno de la célula, se utilizó como máscara (dar valor cero a todos los píxeles que se encuentran fuera de ella) para el canal rojo (marcaje de Iba-1) con el fin de aislar el marcaje Iba-1 que se encuentra dentro de la inyección de LY y eliminar el marcaje correspondiente a otras células adyacentes. De esta manera, comparando

el marcaje Iba-1 con el marcaje LY podemos analizar las posibles alteraciones en dicho marcaje debidas a la hibernación.

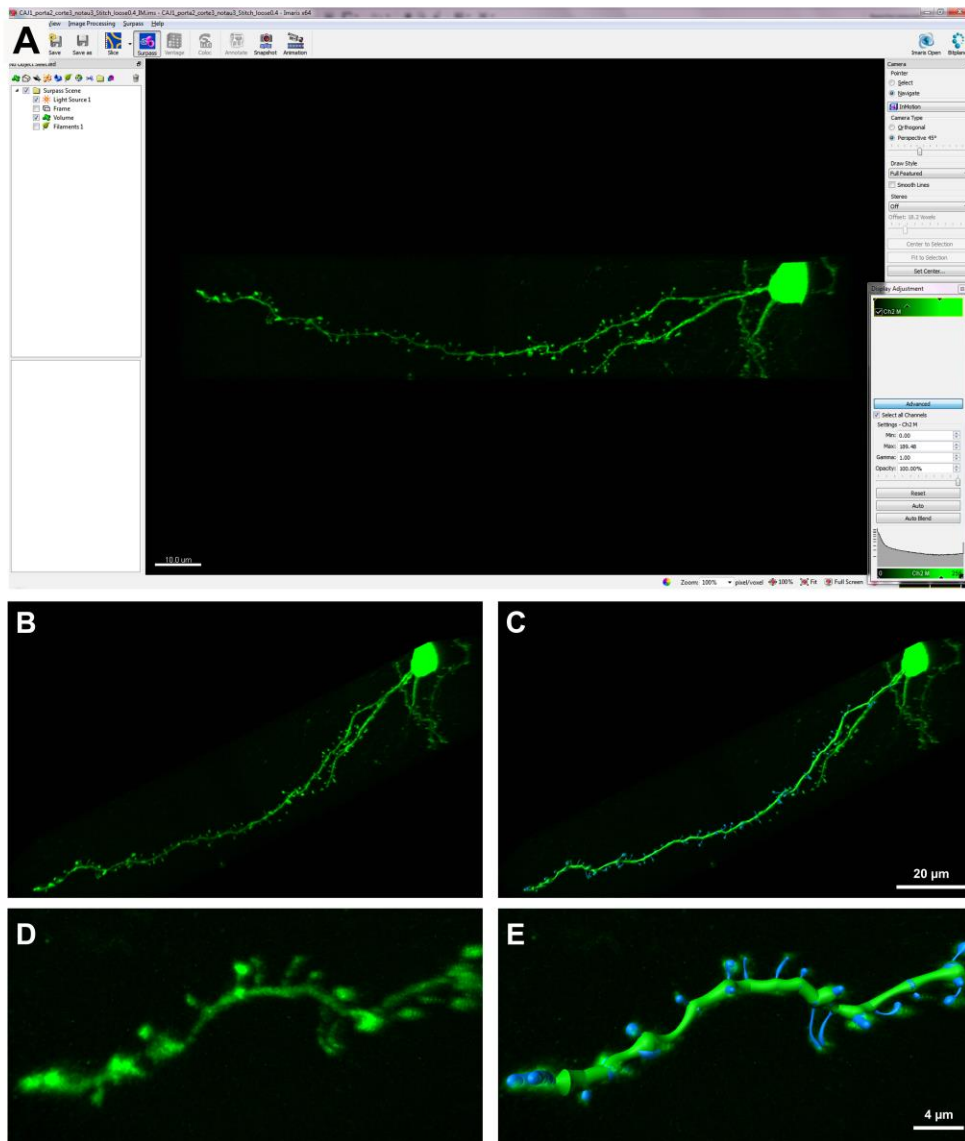


Figura 16| (A) Captura de pantalla del software Imaris en la que se muestra una dendrita basal de una neurona piramidal inyectada del hámster sirio. (B-D) Dendrita que aparece en la figura A y su reconstrucción tridimensional mediante la herramienta *Filament Tracer*. (D-E) Mayor aumento de la región distal de la dendrita y la reconstrucción mostradas en B y C.

Por último, la herramienta *Spots* permite el conteo, mediante la colocación de pequeñas esferas o puntos (*spots*, en inglés) de los objetos de interés en imágenes adquiridas mediante el microscopio confocal. De esta forma, podemos contabilizar la cantidad de neuronas que presentan proteína tau hiperfosforilada y discernir entre los distintos marcajes empleando *spots* de distintos colores.

4.7. *Análisis estadístico*

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando Graph Pad Prism versión 5.00 para Windows (Graph Pad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

Para todos los datos analizados se llevó a cabo un análisis de la normalidad mediante la prueba estadística de Shapiro-Wilk y una prueba de homocedasticidad (homogeneidad de varianza) mediante la prueba de Levene. Todas las distribuciones resultaron ser homocedásticas. Para aquellos datos normales se emplearon pruebas estadísticas para datos paramétricos la prueba t de Student para dos grupos o el ANOVA de 1 vía para más de dos grupos, empleando, en este caso el análisis *post-hoc* de Bonferroni. Para aquellos datos que no cumplieron con la normalidad se emplearon pruebas estadísticas no paramétricas correspondientes: test de Mann-Whitney para dos grupos y test de Kruskal-Wallis para más de dos grupos empleando, en este caso el análisis *post-hoc* de Dunns. Además, para los análisis de Sholl, se compararon los valores en cada punto de distancia al soma mediante el uso de ANOVA de 2 vías utilizando el post-test de Bonferroni y se representaron en forma de histograma de frecuencias estableciendo, para cada grupo de datos, el rango de división de los datos, es decir, el número de clases o bins incluidos se estableció en base al orden de magnitud de dicha distribución.

4.8. *Estudio metabolómico*

Para el estudio metabolómico se combinaron técnicas de espectrometría de masas (MS del inglés *mass spectrometry*) con técnicas de separación de compuestos entre las que se encuentran la cromatografía de gases (GC del inglés *gas chromatography*), cromatografía de líquidos (LC del inglés *liquid chromatography*) y electroforesis capilar (CE del inglés *capillary electrophoresis*). Esta combinación de técnicas permite realizar un análisis diferencial de los perfiles metabólicos durante la hibernación del hámster sirio, es decir, de cambios de concentración de moléculas orgánicas de bajo peso molecular. El estudio fue realizado en el centro de excelencia en metabolómica y bioanálisis (CEMBIO), dirigido por la doctora Coral Barbas.

5. Resultados

Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral se centran en el estudio del efecto de la hiperfosforilación de la proteína tau sobre la morfología de las neuronas piramidales de la corteza somatosensorial del hámster sirio.

Por otro lado, con el fin de profundizar en los mecanismos de fosforilación de la proteína tau y su progresión hasta formar ovillos neurofibrilares, se ha empleado tejido cerebral (área CA1) de pacientes con EA en distintos estadios de la patología en los cuales. Además, se ha llevado a cabo un estudio preliminar de los posibles efectos de la presencia o no de proteína tau hiperfosforilada en la morfología neuronal de las neuronas piramidales de la misma área.

5.1. Hámster sirio

La mayor parte de los análisis llevados a cabo en el hámster sirio se realizaron en neuronas piramidales de capa Va de la corteza somatosensorial primaria ya que, como se detalla en la Introducción de la presente tesis, se trata de una de las regiones del cerebro del hámster sirio en las que se encuentran niveles más elevados de proteína tau hiperfosforilada durante la hibernación, detectada mediante el anticuerpo AT8 (*vid.* Introducción apartado 4.1.2. *El cerebro durante la hibernación*). Adicionalmente, se llevó a cabo un estudio en el área CA3 del hipocampo con el fin de contrastar los resultados obtenidos con la bibliografía existente en dicha área.

5.1.1. Patrones de hiperfosforilación de la proteína tau

Durante la hibernación del hámster sirio, la hiperfosforilación de la proteína tau no se da de forma homogénea en todo el cerebro del animal, sino que varía en función del área cerebral, el tipo celular o el compartimento subcelular. Se ha demostrado que no todas las neuronas expresan la misma cantidad de proteína tau hiperfosforilada (*vid.* Introducción apartado 4.1.2. *El cerebro durante la hibernación*).

Con el fin de estudiar en mayor profundidad los patrones de expresión de la proteína tau hiperfosforilada en el cerebro del hámster sirio durante la hibernación, así como su distribución, se llevaron a cabo tinciones

inmunohistoquímicas empleando el anticuerpo AT8. Es importante destacar que dicho anticuerpo solo detecta la hiperfosforilación de la proteína tau cuando se da específicamente en los aminoácidos Ser202 y Thr205, por lo que al referirnos a la proteína tau hiperfosforilada y a las neuronas que no presentan expresión de esta, nos referimos a aquella proteína tau hiperfosforilada que es detectable por el anticuerpo AT8. No podemos, por tanto, descartar la presencia de fosforilaciones en otros residuos de la proteína tau en células que no muestran marcaje para AT8.

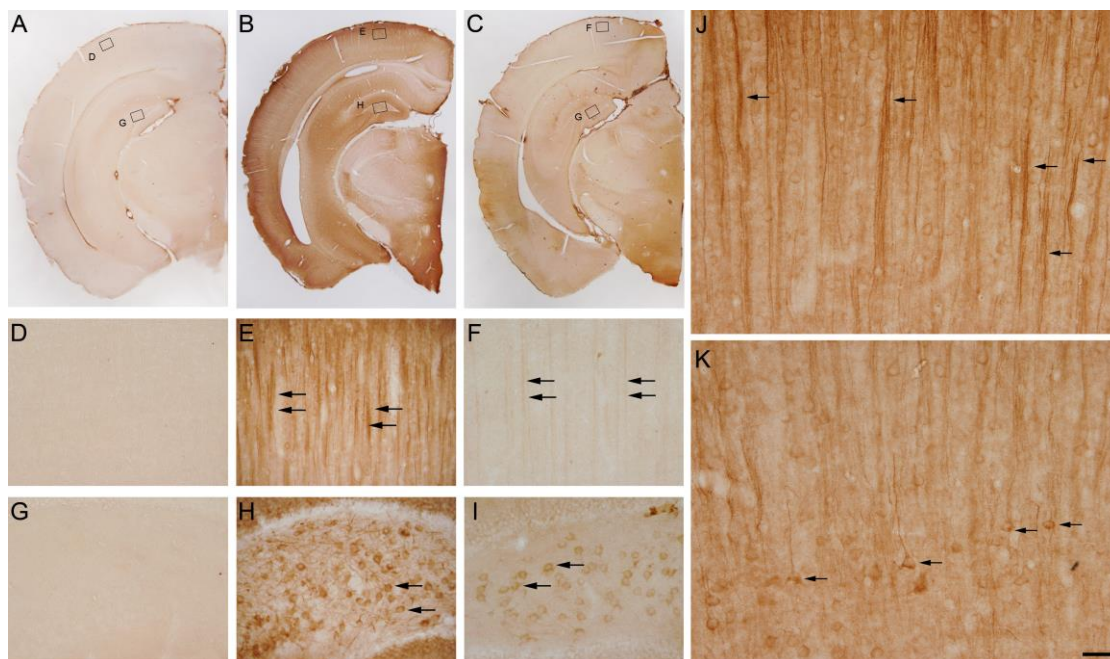


Figura 17| Fotomicrografías para mostrar los patrones de marcaje de tau hiperfosforilada con AT8 en el cerebro de un hámster en eutermia (A, D, G), un hámster en fase de torpor (B, E, H, J, K) y un hámster en fase de *arousal* (C, F, I). Se muestran imágenes representativas de la corteza cerebral (D, E, F) y el hilus del hipocampo (G, H, I) para cada grupo, así como ampliaciones de las capas II-III (J) y las capas IV-V (K) de la corteza somatosensorial del hámster sirio. Las flechas indican dendritas (E, F, J) o somas celulares (H, I, K) AT8 positivos en la capa Va. Barra de escala (en K) indica 1824 μm en A-C, 57 μm en D-I y 75 μm en J y K (Gonzalez-Riano *et al.*, 2019; Regalado-Reyes *et al.*, 2020).

Así pues, comprobamos que, como ya describieron Arendt *et al.* (2003), que en la región del hilus del hipocampo y la región de capa V de la corteza hay células con un marcaje más intenso que en el resto de las áreas del cerebro del hámster (Figura 17). Este marcaje aparece en los somas celulares, así como en la dendrita apical. Además, centrándonos en la capa V de la corteza, observamos que tanto en los somas celulares como en las dendritas apicales que ascienden hacia las capas superficiales de la corteza están marcados (Figura 17). Cabe destacar que existe

heterogeneidad en cuanto al marcaje mediante AT8 en dicha capa, fenómeno gracias al cual ha sido posible llevar a cabo un estudio morfológico comparando aquellas neuronas que presentan un fuerte marcaje AT8 con aquellas en las que no se detecta inmunoreactividad.

5.1.2. Inyecciones intracelulares

5.1.2.1. Hiperfosforilación de tau en las neuronas piramidales inyectadas en la capa Va

Se llevaron a cabo inyecciones intracelulares en 1200 neuronas piramidales, restringiendo el estudio morfológico a aquellas neuronas localizadas en la capa Va de la corteza somatosensorial del hámster sirio para eliminar así la posible variabilidad morfológica existente entre capas o áreas corticales (Figura 19 A-G).

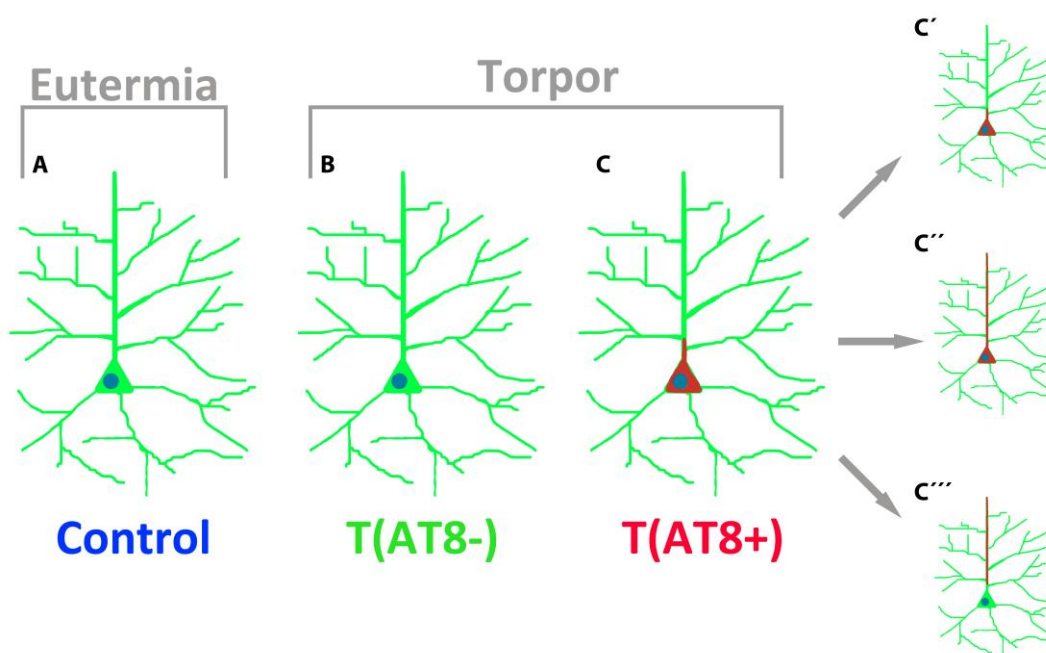


Figura 18| Representación esquemática de las neuronas piramidales inyectadas (LY-verde) de los tres grupos de estudio: eutermia o control (C; azul) (A); torpor PHF-tauAT8 negativas (T(AT8-, verde) (B); y torpor PHF-tauAT8 positivas (T(AT8+, rojo) (C). Además, se muestran los tres tipos de marcaje encontrados en las neuronas PHF-tauAT8 positivas: marcaje en el soma y la zona proximal de la dendrita apical principal (C'), marcaje en el soma y a lo largo de la dendrita apical principal (C'') y marcaje únicamente visible en la dendrita apical principal (C''').

Tras el marcaje inmunohistoquímico utilizando el anticuerpo específico para LY y el anticuerpo PHF-tauAT8, aproximadamente 60% de las células (n=720) mostraban suficiente marcaje con LY como para visualizar correctamente la morfología celular y, por tanto, solamente fueron incluidas estas células en el estudio. Además, algunas células fueron eliminadas del estudio por diversas razones: (i) no ser células piramidales, (ii) estar en otra capa de la corteza o (iii) no mostrar suficiente longitud en su dendrita apical como para poder incluirla en el estudio. En base a esas restricciones, un total de 90 células fueron seleccionadas finalmente para el estudio.

Sin embargo, se encontraron otros dos grupos minoritarios de neuronas con marcaje PHF-tauAT8+: neuronas sin marcaje en el soma celular, pero con marcaje en partes distales de la dendrita apical y neuronas con marcaje tanto en el soma como en la dendrita apical proximal y distal. Estos dos grupos no se han tenido en cuenta para el análisis, ya que el número de neuronas perteneciente a cada uno resultó muy escaso. Por otro lado, cabe destacar la ausencia de marcaje con PHF-tauAT8 en el árbol basal, en las colaterales de la dendrita apical, en el axón y en el interior de las espinas dendríticas (Figura 18).

5.1.2.2. Morfología neuronal e hiperfosforilación de tau

Puesto que la expresión de la proteína tau hiperfosforilada, detectada mediante el anticuerpo AT8, no resulta homogénea en el cerebro del hámster sirio en hibernación y en base a las modificaciones morfológicas descritas anteriormente durante la hibernación, procedimos al estudio de la morfología neuronal comparando la reconstrucción tridimensional del árbol dendrítico de las neuronas inyectadas de los tres grupos descritos previamente.

Para los tres grupos analizados (control, C; torpor PHF-tauAT8-, T(AT8-) y torpor PHF-tauAT8+, T(AT8+)) la morfología celular resultó similar, sin alteraciones o diferencias aparentes a primera vista (Figura 20).

Dado que el marcaje AT8, en caso de estar presente, lo hace únicamente en la dendrita apical y no en las basales, cabe esperar que existan diferencias entre ambos árboles dendríticos, por lo que el árbol dendrítico basal y el árbol dendrítico apical se analizaron por separado.

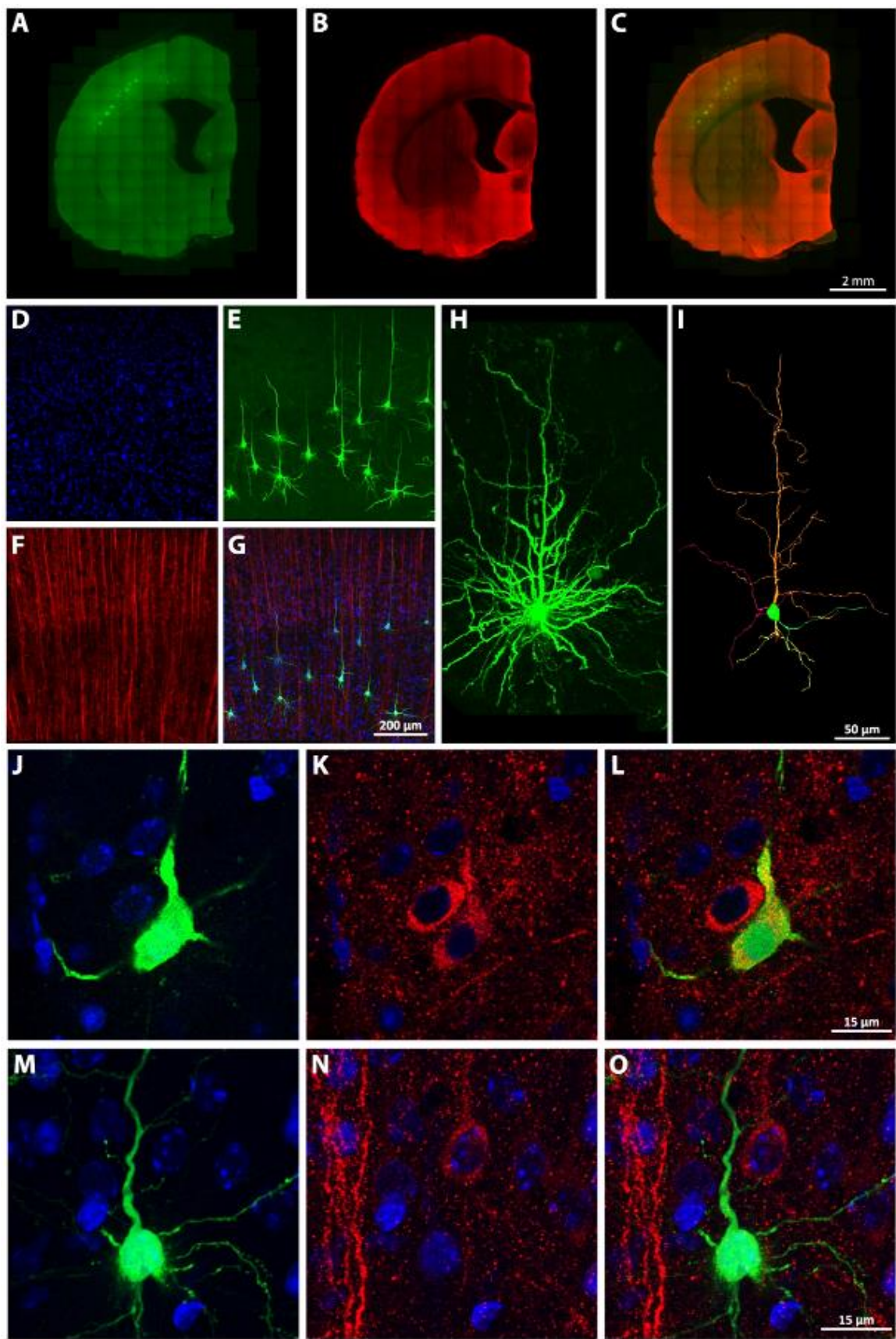


Figura 19| (A-C) Imágenes panorámicas de un corte correspondiente a un hemisferio del cerebro del hámster sirio con neuronas inyectadas intracelularmente con LY (verde, A) que fueron procesadas inmunohistoquímicamente para visualizar AT8 (rojo, B). La combinación de ambas imágenes se ilustra en (C). (D-G) Mayor aumento de una región correspondiente a la corteza somatosensorial del corte mostrado en (A-C) visualizando DAPI en azul (D), LY en verde (E), AT8 en rojo (F) y los tres juntos (G). (H) Mayor aumento de una de las neuronas piramidales inyectadas mediante LY. (I) Reconstrucción tridimensional de dicha neurona mediante el software Neurolucida 360. (J-O) Imagen confocal de una neurona piramidal AT8+ mostrando LY en verde junto con DAPI en azul (J), AT8 en rojo junto con DAPI en azul (K) y ambos junto con DAPI (L). (M-O) Imagen confocal de una neurona piramidal AT8- mostrando LY en verde junto con DAPI en azul (M), AT8 en rojo junto con DAPI en azul (N) y ambos junto con DAPI (O). Las barras de escala se muestran para cada conjunto de imágenes y equivalen a: 2 mm en A-C; 200 μ m en D-G; 50 μ m en H-I y 15 μ m en J-O (Figura tomada de Regalado-Reyes et al., 2020).

De ambos se analizaron los siguientes parámetros: número de intersecciones, número de nodos, número de terminaciones, diámetro de la dendrita y longitud, área y volumen del árbol dendrítico. Cada variable se analizó como valor medio total y en función de la distancia al soma mediante el análisis de Sholl (*vid.* Materiales y Métodos apartado 3.6.1. *Neurolucida*). Además, para ambos árboles dendríticos, se llevó a cabo un análisis por segmentos por orden de ramificación en el que se incluyeron las variables: tortuosidad, diámetro, longitud, área y volumen.

Morfología neuronal: dendrita apical

En lo que respecta a las variables que expresan la complejidad neuronal (número de intersecciones, número de nodos y número de terminaciones), observamos que los valores más elevados corresponden al grupo control. En el caso del número de intersecciones, el grupo torpor (tanto AT8- como AT8+) mostró significativamente menor número total de intersecciones que el grupo control. Además, al estudiar su distribución en función de la distancia al soma, a pesar de que los tres grupos mostraron una curva con un patrón similar, el grupo control mostró valores significativamente mayores que el grupo T(AT8-) a 90, 100, 120 y 130 μ m del soma (Figura 21 A-B; Tabla 4).

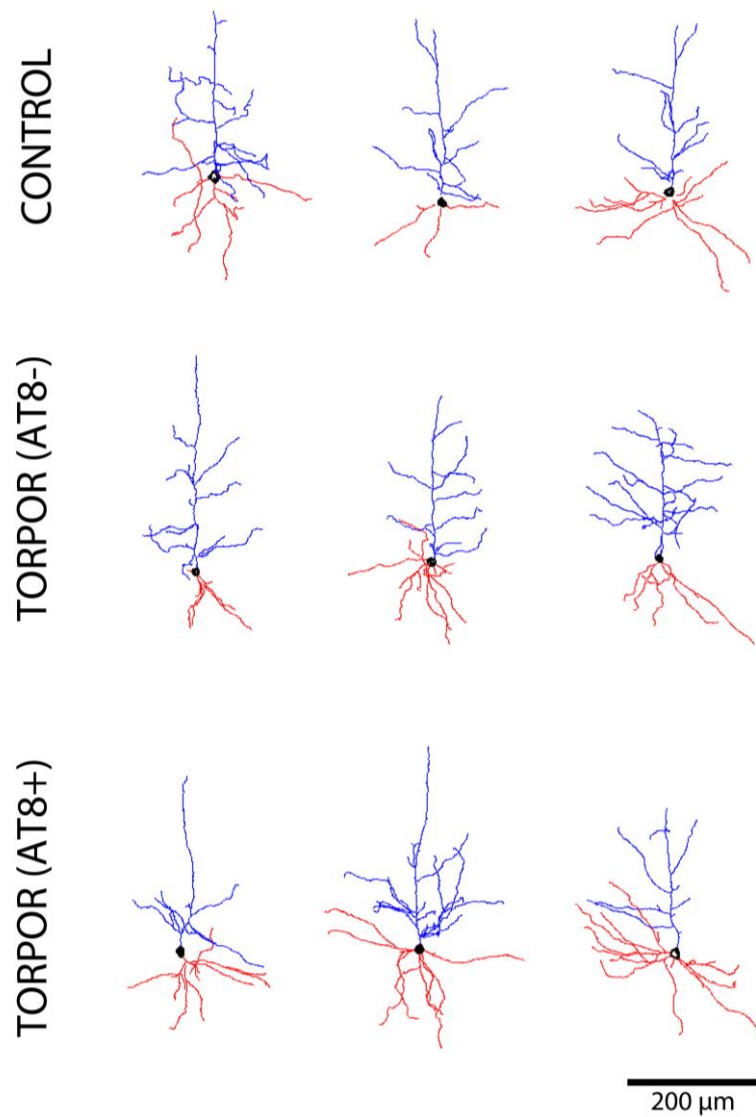


Figura 20| Ilustraciones representativas de 3 neuronas piramidales de capa V de la corteza somatosensorial del hámster sirio pertenecientes al grupo control; 3 neuronas pertenecientes al grupo torpor PHF-tauAT8-; y 3 neuronas pertenecientes al grupo torpor PHF-tauAT8+. La dendrita apical aparece en color azul, las dendritas basales en rojo y el soma en negro. Barra de escala: 200 μm (Figura tomada de Regalado-Reyes et al., 2020).

En cuanto al número de nodos y al número de terminaciones, el grupo T(AT8+) mostró valores significativamente menores que los otros dos grupos. Además, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo T(AT8-). Con respecto a su distribución en función de la distancia al soma, los tres grupos presentan curvas con patrones similares (Figura 21 C-F; Tabla 4).

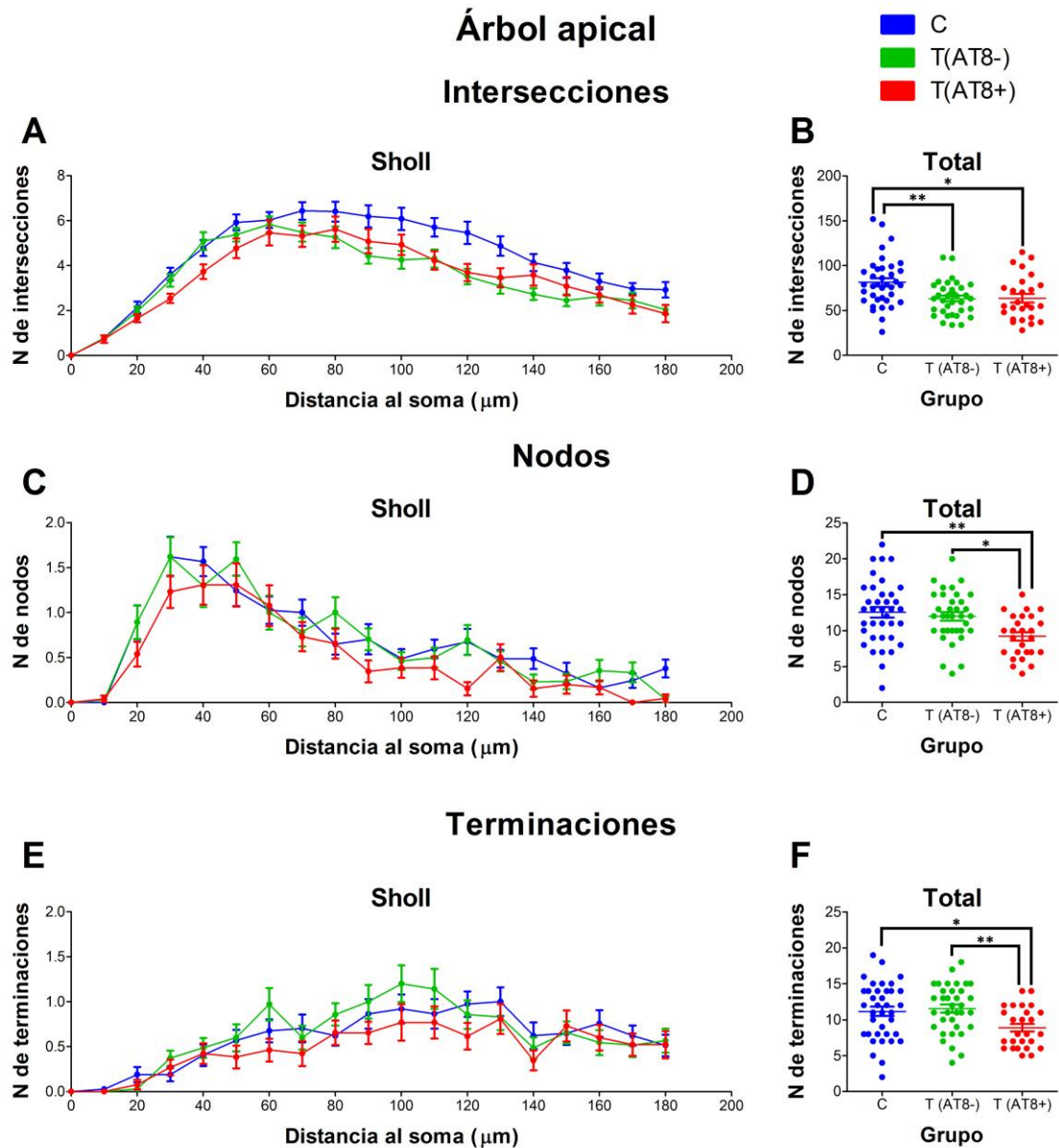


Figura 21| Gráficos en los que se muestran las variables que expresan la complejidad neuronal de las dendritas apicales: número de intersecciones (A-B), número de nodos (C-D) y número de terminaciones (E-F) en forma de distribución en función de la distancia al soma y como media de los valores totales. C (azul), T(AT8-) (verde) y T(AT8+) (rojo). Media \pm de. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ (Figura tomada de Regalado-Reyes et al., 2020).

Tabla 4| Significación estadística de los resultados mostrados en la figura 21.
***p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001.**

Árbol apical intersecciones. Media de los valores totales.			
	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
K=11.60	**	*	ns
Árbol apical nodos. Media de los valores totales.			
	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
F=6.507	ns	**	*
Árbol apical terminaciones. Media de los valores totales.			
	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
F=6.507	ns	*	**
Árbol apical intersecciones. Análisis sholl.			
Distancia al soma (µm)	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
90	*	ns	ns
100	**	ns	ns
110	ns	ns	ns
120	**	*	ns
130	*	ns	ns
Árbol apical terminaciones. Análisis sholl.			
Distancia al soma (µm)	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
90	ns	ns	*

En relación con las variables que expresan la morfología neuronal (diámetro, longitud, área y volumen), no se encontraron diferencias significativas al comparar los valores medios totales para ninguna de las variables (Figura 22 B, D, F, H). Sin embargo, al analizar la distribución de los valores en función de la distancia al soma y a pesar de que los tres grupos mostraron curvas con el mismo patrón, se encontró una reducción significativa en el diámetro del grupo T(AT8+) a 10 µm del soma comparado tanto con el grupo control como con el grupo T(AT8-) (Figura 22 A; Tabla 5), así como una disminución significativa de la longitud y el área en el grupo T(AT8+) a 120 µm del soma al compararse con el grupo control. (Figura 22 C y E; Tabla 5).

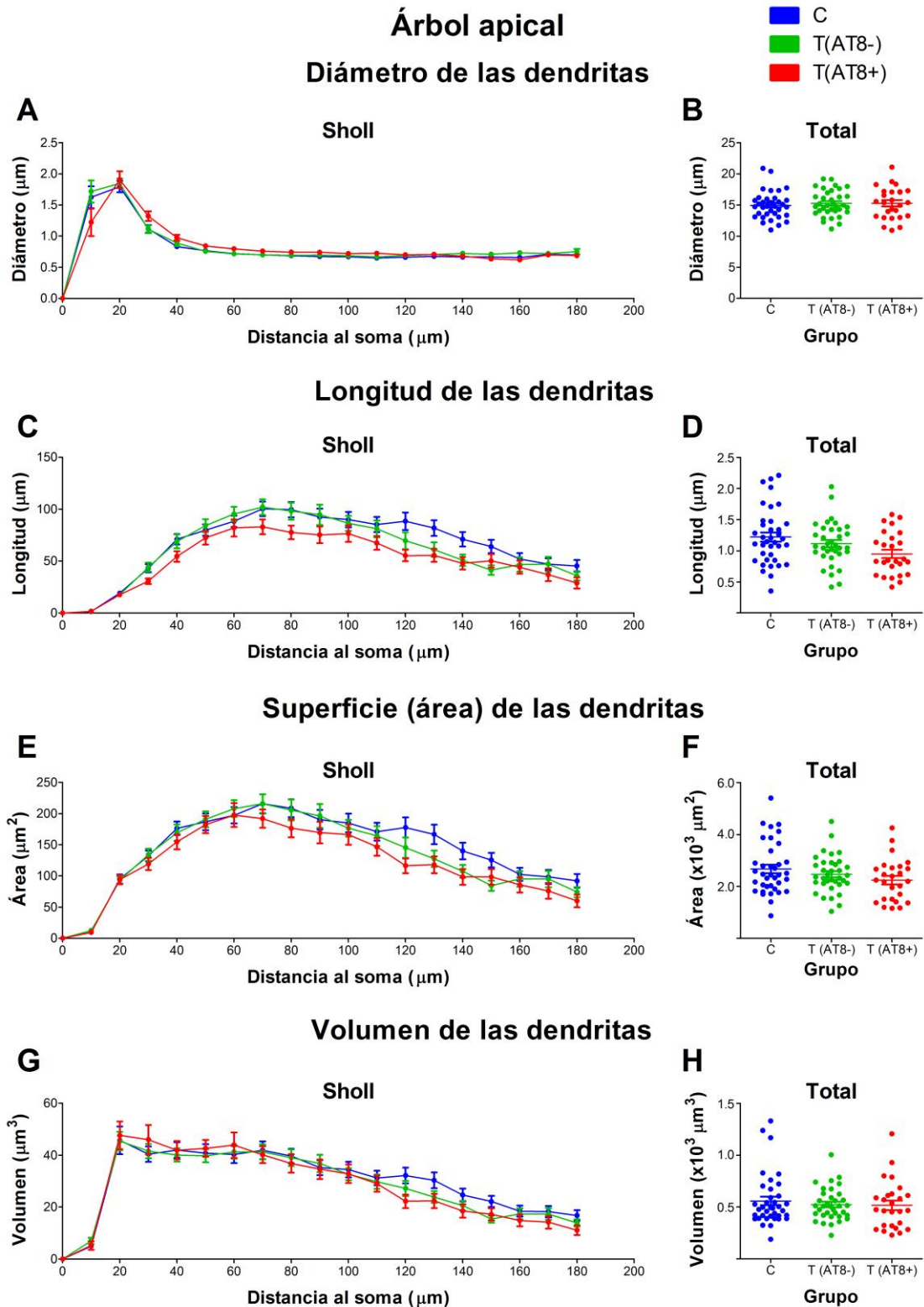


Figura 22| Gráficos en los que se muestran las variables que expresan la morfología neuronal de las dendritas apicales: diámetro dendrítico (A-B), longitud (C-D), área (E-F) y volumen (G-H) en forma de distribución en función de la distancia al soma y como media de los valores totales para los tres grupos de estudio: C (azul), T(AT8-) (verde) y T(AT8+) (rojo). Media \pm de. (Figura tomada de Regalado-Reyes et al., 2020).

Tabla 5| Significación estadística de los resultados mostrados en la figura 22.
***p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001.**

Árbol apical diámetro medio. Análisis sholl.			
Distancia al soma (μm)	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
10	ns	***	***
Árbol apical longitud. Análisis sholl.			
Distancia al soma (μm)	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
120	ns	*	ns
Árbol apical superficie (área). Análisis sholl.			
Distancia al soma (μm)	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
120	ns	*	ns

Además de las variables morfológicas ya expuestas, analizamos la distancia con respecto al soma a la que emergen las dendritas colaterales en la porción de dendrita apical comprendida entre 0 y 180 μm desde el soma. Para ello, analizamos la distancia desde el soma a la que aparecen nodos en la dendrita apical principal. Comparamos desde la primera a la sexta dendritas colaterales y no encontramos diferencias significativas en la distancia a la que emergen de la dendrita apical principal entre ninguno de los grupos (Figura 23).

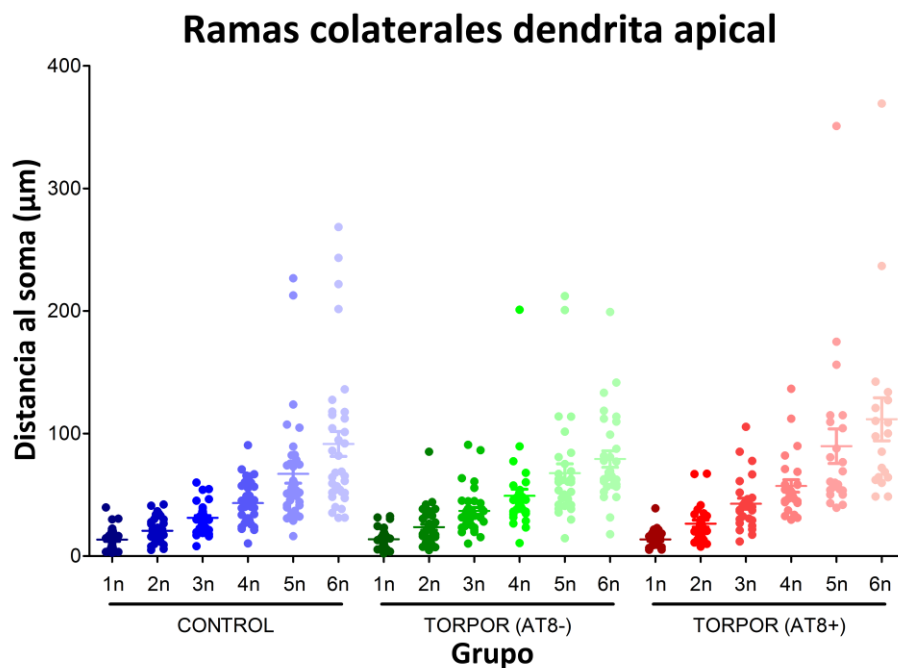


Figura 23| Gráfica en la que se muestra la distancia con respecto al soma a la que emerge cada una de las seis primera dendritas colaterales, expresada como la distancia con respecto al soma a la que se encuentran los seis primeros nodos en el tronco principal de la dendrita apical, en el grupo control (azul), T(AT8-) (verde) y T(AT8+) (rojo). Media±de. (Figura tomada de Regalado-Reyes et al., 2020).

Morfología neuronal: dendritas basales

Al igual que en el caso de las dendritas apicales, para las dendritas basales de analizaron las variables que expresan complejidad neuronal, no encontrando diferencias significativas entre grupos en ninguna de ellas al comparar valores totales (Figura 24 B, D, F). Sin embargo, al analizar los datos en función de la distancia al soma, para el número de nodos, aparece un aumento significativo de los valores del grupo T(AT8+) al compararse con el grupo T(AT8-) y con el grupo control a 20 y 40 μm desde el soma (Figura 24 C; Tabla 6).

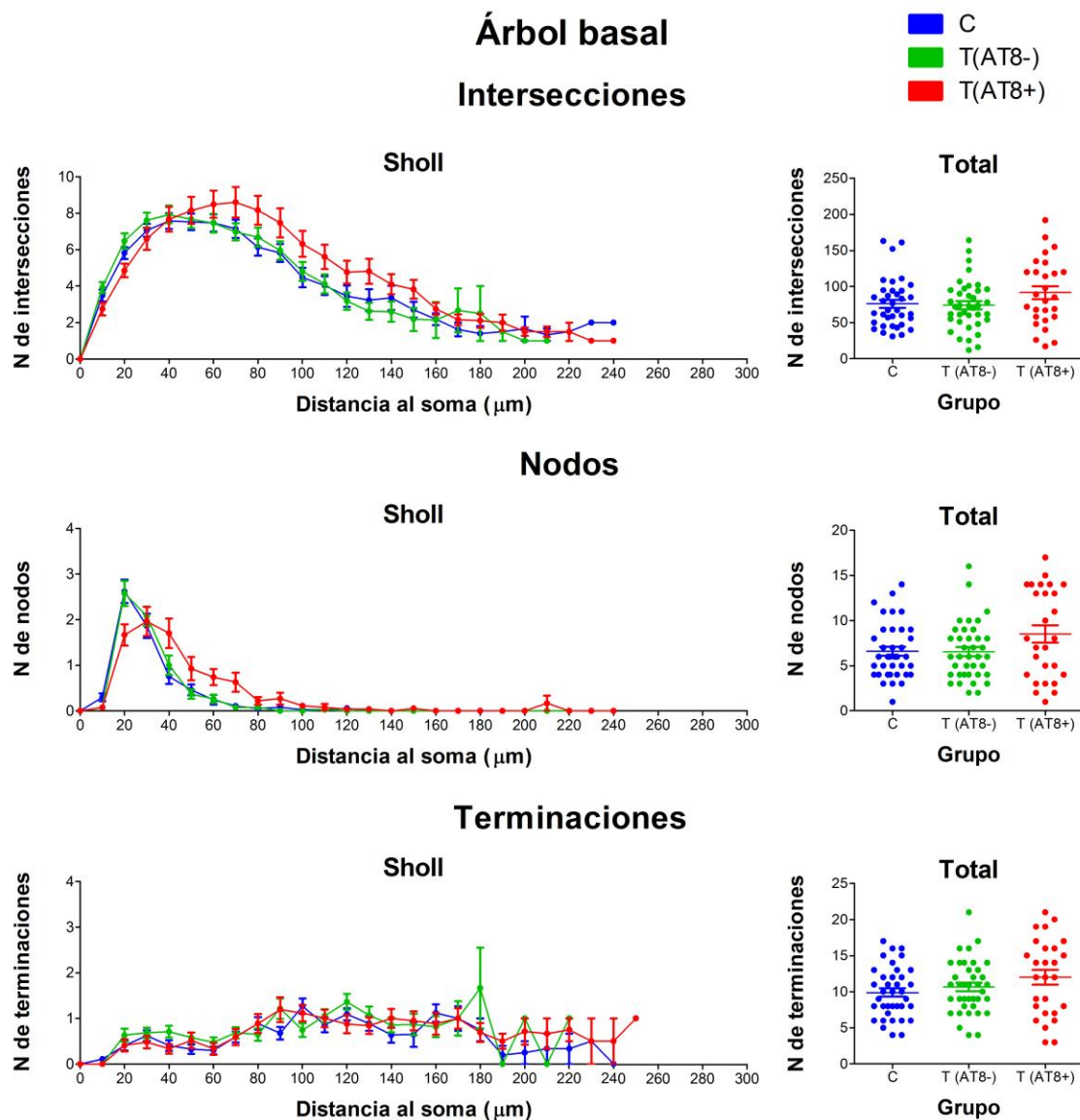


Figura 24| Gráficos en los que se muestran las variables que expresan la complejidad neuronal de las dendritas basales: número de intersecciones (A-B), número de nodos (C-D) y número de terminaciones (E-F) en forma de distribución en función de la distancia al

soma y como media de los valores totales para los tres grupos de estudio: C (azul), T(AT8-) (verde) y T(AT8+) (rojo). Media \pm de. (Figura tomada de Regalado-Reyes et al., 2020).

Tabla 6| Significación estadística de los resultados mostrados en la figura 24.
* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

Árbol basal nodos. Análisis sholl.			
Distancia al soma (μm)	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
20	ns	***	***
30	ns	ns	ns
40	ns	***	*

En referencia a las variables morfológicas, el diámetro de las dendritas muestra valores totales significativamente mayores en el grupo T(AT8+) cuando se compara con los otros dos grupos (Figura 25 B; Tabla 7). Además, este aumento en los valores totales en el grupo T(AT8+) se ve también reflejado al comparar la distribución de dichos valores en función de la distancia al soma, encontrando valores significativamente mayores en el grupo T(AT8+) a 20 y 30 μm del soma cuando lo comparamos con el grupo control y a en el intervalo de 20 a 60 μm del soma cuando se compara con el grupo T(AT8-) (Figura 25 A; Tabla 7). Por otro lado, se encuentra un aumento en el volumen de las dendritas, obteniendo valores medios totales significativamente mayores en el grupo T(AT8+) al compararse con el control (Figura 25 I; Tabla 7). Además, este resultado se refleja en la representación de los datos en función de la distancia al soma, encontrando valores de volumen dendrítico significativamente mayores en el grupo T(AT8+) entre 50 y 100 μm al compararse con el grupo control y entre 50 y 70 μm al compararse con el grupo T(AT8-) (Figura 25 H; Tabla 7). En cuanto a la longitud y el área de las dendritas basales, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a los valores totales (Figura 25 D y G). Sin embargo, en el caso del área, al comparar la distribución de los valores en función a la distancia al soma, los valores del grupo T(AT8+) son significativamente mayores cuando se comparan con el grupo T(AT8-) y con el grupo control a 90 y 100 μm desde el soma (Figura 25 F; Tabla 7).

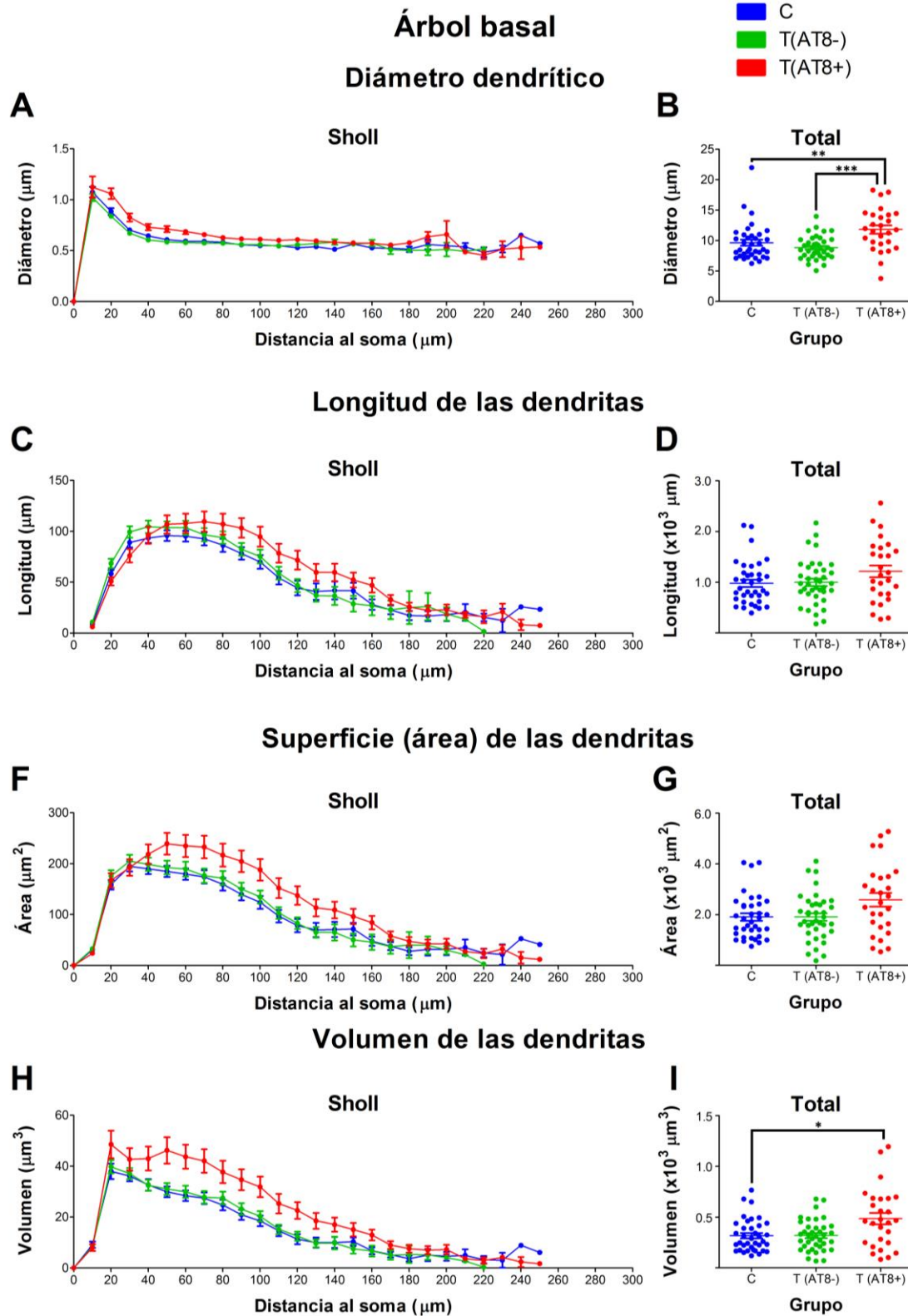


Figura 25| Gráficos en los que se muestran las variables que expresan la morfología neuronal de las dendritas basales: diámetro dendrítico (A-B), longitud (C-D), área (E-F) y volumen (G-H) en forma de distribución en función de la distancia al soma y como media de los valores totales para los tres grupos de estudio: C (azul), T(AT8-) (verde) y T(AT8+) (rojo). Media \pm de. ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$. (Figura tomada de Regalado-Reyes et al., 2020).

Tabla 7 | Significación estadística de los resultados mostrados en la figura 25.
***p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001.**

Tabla xx Árbol basal diámetro medio. Análisis sholl.			
Distancia al soma (µm)	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
20	ns	***	***
30	ns	***	***
40	ns	*	***
50	ns	**	***
60	ns	**	***
70	ns	ns	*
Tabla xx Árbol basal diámetro medio. Media de los valores totales.			
	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
F=6.507	ns	**	***
Tabla xx Árbol basal superficie (área). Análisis sholl.			
Distancia al soma (µm)	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
190	ns	*	ns
Tabla xx Árbol basal volumen. Media de los valores totales.			
	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
F=6.507	ns	*	ns

Asimismo, se analizó el número de dendritas basales primarias en cada uno de los grupos y no se encontraron diferencias significativas entre los mismos, mostrando unos valores de $3,459 \pm 1,3$ en el grupo control, $4,132 \pm 1,597$ en el grupo T(AT8-) y $3,556 \pm 1,368$ en el grupo T(AT8+) (Media \pm de).

A modo de resumen, los datos obtenidos respecto a la morfología de las neuronas completas, tanto el análisis de las dendritas apicales (región proximal) como de las dendritas basales durante la hibernación del hámster sirio, revelan que existen alteraciones morfológicas, especialmente en aquellas células en las que la proteína tau se encuentra hiperfosforilada. Estos cambios principalmente comprenden un aumento en el diámetro de las dendritas basales y una disminución de la complejidad de las dendritas apicales reflejada en forma de un menor número de nodos, intersecciones y terminaciones.

Análisis por segmentos dendritas apicales

Una vez analizadas las neuronas en su conjunto, se procedió a llevar a cabo un análisis por segmentos empleando únicamente los segmentos intermedios, así como los segmentos terminales completos (*vid.* Materiales y Métodos apartado 3.6.1 *Neurolucida*). De esta manera, se obtiene una visión más detallada de las posibles variaciones morfológicas que tienen lugar en las neuronas durante la

hibernación del hámster sirio, analizando las variables: tortuosidad, diámetro, longitud, área y volumen de los segmentos en función de su orden de ramificación.

Así pues, observamos que, tanto en los segmentos terminales como en los segmentos intermedios, se encuentran valores de tortuosidad más altos en los grupos de torpor, especialmente en el grupo T(AT8+). En el caso de los segmentos intermedios, estas diferencias son significativas en los segmentos de orden 2, 3, 5 y 7. En el caso de los segmentos terminales, las diferencias son significativas en los segmentos de orden 6 y 10 (Figura 26 A-B; Tabla 8). En cuanto al diámetro de los segmentos de la dendrita apical, no encontramos diferencias significativas entre grupos en ningún orden, tanto en los segmentos intermedios como en los segmentos terminales (Figura 26 C-D). Respecto a la longitud de los segmentos de la dendrita apical, encontramos diferencias significativas en los segmentos intermedios de orden 3 y en los segmentos terminales de orden 6, siendo los valores del grupo T(AT8+) mayores que los del grupo control en ambos tipos de segmento (Figura 26 E-F; Tabla 8). En cuanto al área de los segmentos, observamos diferencias significativas en los segmentos intermedios de orden 3, siendo los valores del grupo T(AT8+) mayores que los del grupo control y diferencias significativas en los segmentos terminales de orden 7, siendo los valores del grupo T(AT8+) mayores que los del grupo T(AT8-) pero sin obtener diferencias con el grupo control (Figura 26 G-H; Tabla 8). Por último, en lo que respecta al volumen de los segmentos de la dendrita apical, observamos diferencias significativas en los segmentos intermedios de orden 3, siendo los valores del grupo T(AT8+) mayores que los del grupo control y diferencias significativas en los segmentos de orden 7 terminales, siendo los valores del grupo T(AT8-) menores que los del grupo T(AT8+) y que los del grupo control (Figura 26 I-J; Tabla 8).

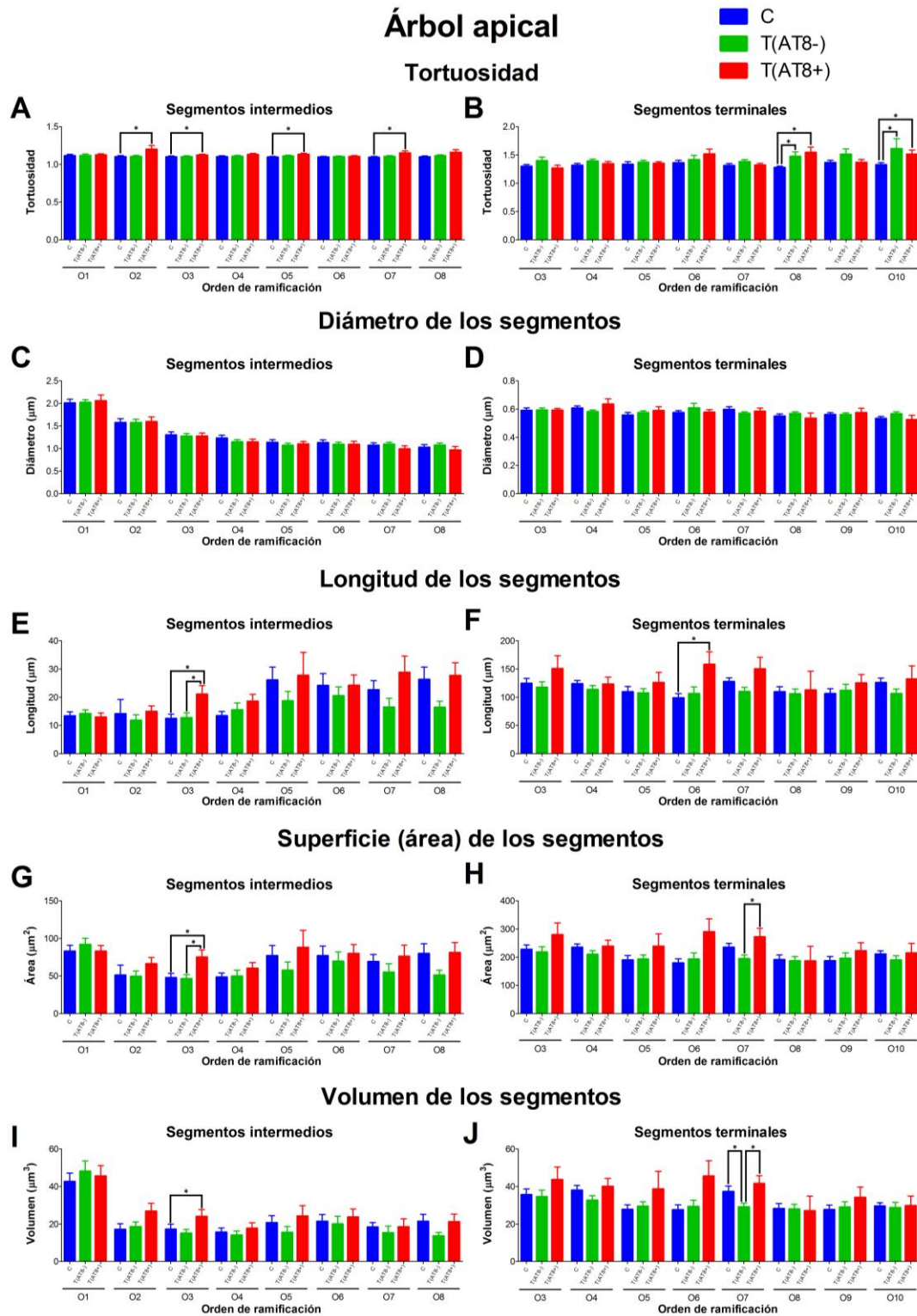


Figura 26| Gráfico que muestra el análisis morfológico de las dendritas apicales por segmentos: segmentos intermedios (SI) y segmentos terminales (ST). Para los tres grupos: C (azul), T(AT8-) (verde) y T(AT8+) (rojo) se muestran los valores de: tortuosidad, para los SI (A) y para los ST (B); diámetro, para los SI (C) y para los ST (D); longitud, para los SI (E) y para los ST (F); área, para los SI (G) y para los ST (H); y volumen para los SI (I) y para los ST (J) analizados en función del orden de ramificación (O1 a O10). Media±DE. *p<0,05. (Figura tomada de Regalado-Reyes et al., 2020).

Tabla 8 | Significación estadística de los resultados mostrados en la figura 26.
***p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001.**

Árbol apical segmentos intermedios tortuosidad			
	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
Orden 2; K= 7,668	ns	*	ns
Orden 3; K= 6,689	ns	*	ns
Orden 5; K= 7,866	ns	*	ns
Orden 7; K= 7,763	ns	*	ns
Árbol apical segmentos terminales tortuosidad			
	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
Orden 8; K= 11,49	*	*	ns
Orden 10; K= 10,15	*	*	ns
Árbol apical segmentos intermedios longitud			
	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
Orden 3; K= 9,887	ns	*	*
Árbol apical segmentos terminales longitud			
	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
Orden 6; K= 5,816	ns	*	ns
Árbol apical segmentos intermedios superficie (área)			
	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
Orden 3; K= 9,401	ns	*	*
Árbol apical segmentos terminales superficie (área)			
	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
Orden 3; K= 9,401	ns	ns	*
Árbol apical segmentos intermedios volumen			
	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
Orden 3; K= 7,281	ns	*	ns
Árbol apical segmentos terminales volumen			
	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
Orden 7; K= 10,60	*	ns	*

Análisis por segmentos dendritas basales

En cuanto a las dendritas basales, en base al análisis de la tortuosidad, nuestros resultados indican que los valores para el grupo T(AT8-) son significativamente más altos que en el grupo control en los segmentos intermedios de orden 1 y en los segmentos terminales de orden 2. Sin embargo, no encontramos diferencias con el grupo T(AT8+) (Figura 27 A-B; Tabla 9). Respecto al diámetro de los segmentos de las dendritas basales, encontramos un aumento significativo en los valores del grupo T(AT8+) tanto en los segmentos intermedios como en los terminales. En el caso de los segmentos intermedios, esta diferencia aparece en los segmentos de orden 1 en comparación con el grupo control y el grupo T(AT8-) y en los segmentos de orden 2 en comparación con el grupo T(AT8+). Por otro lado, en los segmentos terminales, observamos este aumento

significativo del diámetro en los segmentos de orden 2 y 3 al compararse con el grupo T(AT8-) pero no con respecto al grupo control (Figura 27 C-D; Tabla 9). En lo que respecta a la longitud de los segmentos de las dendritas basales, observamos un aumento significativo en los valores de longitud del grupo T(AT8+) para ambos tipos de segmento. En el caso de los segmentos intermedios, los valores de longitud obtenidos en el grupo T(AT8+) son mayores a los del grupo control de orden 1 y de orden 3, pero no aparecen diferencias en cuanto al grupo T(AT8-). En cuanto a los segmentos terminales, los valores de longitud obtenidos para el grupo T(AT8+) son mayores a los del grupo control y el grupo T(AT8-) en los segmentos de orden 2 y 3 y mayores a los del grupo T(AT8-) en los segmentos de orden 4 (Figura 27 E-F; Tabla 9).

Con respecto al área de los segmentos de las dendritas basales, observamos también un aumento significativo en los valores de área del grupo T(AT8+) para ambos tipos de segmento. En el caso de los segmentos intermedios, los valores de área obtenidos en el grupo T(AT8+) son mayores a los del grupo control y T(AT8-) en los segmentos de orden 1 y mayores que los del grupo T(AT8-) en los segmentos de orden 2 y 3. En cuanto a los segmentos terminales, los valores de área obtenidos para el grupo T(AT8+) son mayores a los del grupo control y el grupo T(AT8-) en los segmentos de orden 2 y 3 y mayores a los del grupo T(AT8-) en los segmentos de orden 4 (Figura 27 G-H; Tabla 9).

Para finalizar, en relación con los valores de volumen de los segmentos de las dendritas basales, se observa un aumento significativo en los valores de volumen del grupo T(AT8+) para ambos tipos de segmento. En el caso de los segmentos intermedios, los valores de volumen obtenidos en el grupo T(AT8+) son mayores a los del grupo control y T(AT8-) en los segmentos de orden 1 y 2 mayores que los del grupo T(AT8-) en los segmentos de orden 3. En cuanto a los segmentos terminales, los valores de volumen obtenidos para el grupo T(AT8+) son mayores a los del grupo control y el grupo T(AT8-) en los segmentos de orden 2 y 3 (Figura 27 I-J; Tabla 9).

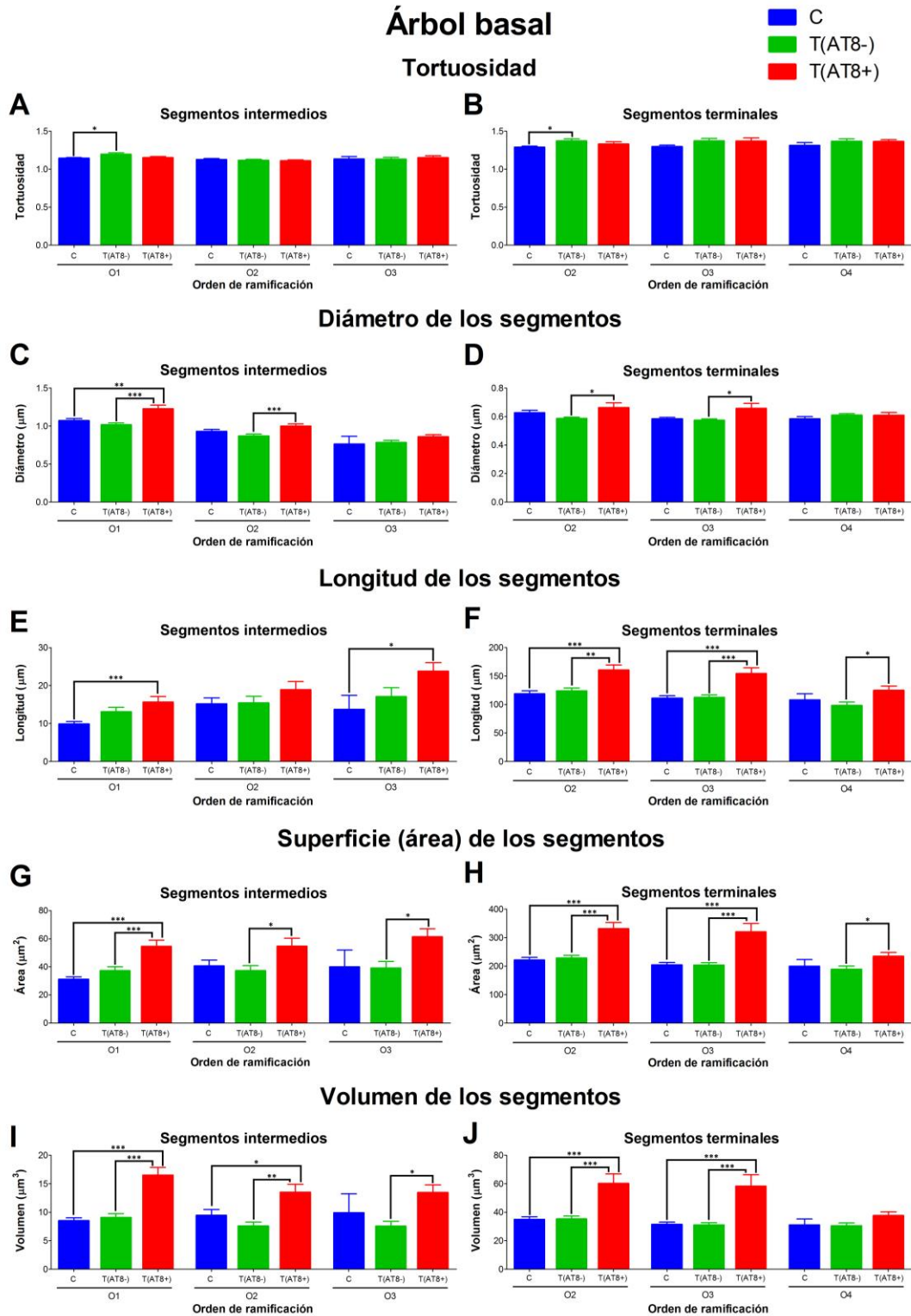


Figura 27| Gráfico que muestra el análisis morfológico de las dendritas apicales por segmentos: segmentos intermedios (SI) y segmentos terminales (ST). Para los tres grupos: C (azul), T(AT8-) (verde) y T(AT8+) (rojo) se muestran los valores de: tortuosidad, para los SI (A) y para los ST (B); diámetro, para los SI (C) y para los ST (D); longitud, para los SI (E) y para los ST (F); área, para los SI (G) y para los ST (H); y volumen para los SI (I) y para los ST (J) analizados en función del orden de ramificación (O1 a O4). Media±DE. *p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001. (Figura tomada de Regalado-Reyes et al., 2020).

Tabla 9 | Significación estadística de los resultados mostrados en la figura 27.
 *p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001.

Árbol basal segmentos intermedios tortuosidad			
	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
Orden 1; K= 6,628	*	ns	ns
Árbol basal segmentos terminales tortuosidad			
	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
Orden 2; K= 8,423	*	ns	ns
Árbol basal segmentos intermedios diámetro medio			
	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
Orden 1; K= 16,87	ns	**	***
Orden 2; K= 15,63	ns	*	ns
Árbol basal segmentos terminales diámetro medio			
	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
Orden 2; K= 7,718	ns	ns	*
Orden 3; K= 6,737	ns	ns	*
Árbol basal segmentos intermedios longitud			
	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
Orden 1; K= 13,83	ns	***	ns
Orden 3; K= 8,595	ns	*	ns
Árbol basal segmentos terminales longitud			
	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
Orden 2; K= 13,26	ns	***	**
Orden 3 K= 15,38	ns	***	***
Orden 4; K= 8,206	ns	ns	*
Árbol basal segmentos intermedios superficie (área)			
	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
Orden 1; K= 23,68	ns	***	***
Orden 2; K= 7,506	ns	ns	*
Orden 3; K= 9,829	ns	ns	*
Árbol basal segmentos terminales superficie (área)			
	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
Orden 2; K= 20,03	ns	***	**
Orden 3 K= 18,35	ns	***	***
Orden 4; K= 7,582	ns	ns	*
Árbol basal segmentos intermedios volumen			
	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
Orden 1; K= 31,24	ns	***	***
Orden 2; K= 13,21	ns	*	**
Orden 3; K= 10,30	ns	ns	*
Árbol basal segmentos terminales volumen			
	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
Orden 2; K= 20,95	ns	***	***
Orden 3; K= 16,76	ns	***	***

A modo de resumen, los resultados obtenidos en cuanto al análisis por segmentos indican que, en el caso de las neuronas del grupo T(AT8-) hay poca variación con respecto al grupo control, destacando únicamente un aumento de la tortuosidad, tanto en los segmentos terminales de orden elevado en sus dendritas apicales como en los segmentos intermedios y segmentos terminales de orden bajo de sus dendritas basales. En el caso del grupo T(AT8+) se observa un importante aumento de la tortuosidad en los segmentos terminales y los segmentos intermedios, así como un aumento en su longitud, área y volumen. En cuanto a sus dendritas basales, encontramos un aumento en el diámetro de los segmentos tanto terminales como intermedios, así como un incremento en la longitud, área y volumen de estos. Estos resultados podrían indicar una retracción de las neuronas, una especie de encogimiento del tejido que haría que aumentasen los valores de longitud, área y volumen, así como el de tortuosidad.

5.1.2.3. Resumen de los resultados obtenidos en cuanto a la morfología neuronal

Las tablas 10 y 11 muestran un resumen de los resultados obtenidos con respecto al estudio de la morfología neuronal en neuronas de capa V de la corteza somatosensorial del hámster sirio.

Tabla 10| Resumen de los resultados obtenidos con respecto al análisis de morfología neuronal en las dendritas apicales. *p<0,05; **p<0,001; *p<0,0001.**

			C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs (AT8+)
Árbol apical Reconstrucción células completas	Intersecciones	total	**	*	ns
		Sholl	* 90, 130; ** 100, 120 µm	* 120 µm	ns
	Nodos	total	ns	**	*
		Sholl	ns	ns	ns
	Terminaciones	total	ns	*	**
		Sholl	ns	ns	* 90 µm
	Diámetro	total	ns	ns	ns
		Sholl	ns	*** 10 µm	*** 10 µm
	Longitud	total	ns	ns	ns
		Sholl	ns	* 120 µm	ns
	Superficie (área)	total	ns	Ns	ns
		Sholl	ns	* 120 µm	ns
	Volumen	total	ns	ns	ns
		Sholl	ns	ns	ns
Árbol apical Análisis de segmentos por orden de ramificación	Tortuosidad	Intermedio	ns	* 02, 03, 05, 07	ns
		Terminal	* 08, 010	* 08, 010	ns
	Diámetro	Intermedio	ns	ns	ns
		Terminal	ns	ns	ns
	Longitud	Intermedio	ns	* 03	* 03
		Terminal	ns	* 06	ns
	Superficie (área)	Intermedio	ns	* 03	* 03
		Terminal	ns	ns	* 07
	Volumen	Intermedio	ns	* 03	ns
		Terminal	* 07	ns	* 07

Tabla 11| Resumen de los resultados obtenidos con respecto al análisis de morfología neuronal en las dendritas basales. *p<0,05; **p<0,001; *p<0,0001.**

			C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs (AT8+)
Árbol apical Reconstrucción células completas	Intersecciones	total	ns	ns	ns
		Sholl	ns	ns	ns
	Nodos	total	ns	ns	ns
		Sholl	ns	*** 20, 40 µm	*** 20 µm; * 40 µm
	Terminaciones	total	ns	ns	ns
		Sholl	ns	ns	ns
	Diámetro	total	ns	**	***
		Sholl	ns	*** 20-30 µm; ** 50-60 µm; * 40 µm	*** 20-60 µm; * 70 µm
	Longitud	total	ns	ns	ns
		Sholl	ns	ns	ns
	Superficie (área)	total	ns	ns	ns
		Sholl	ns	* 90 µm	ns
	Volumen	total	ns	*	ns
		Sholl	ns	** 50-70 µm; * 80-100 µm	** 50, 70 µm; * 60 µm
Árbol apical Análisis de segmentos por orden de ramificación	Tortuosidad	Intermedio	* O1	ns	ns
		Terminal	* O2	ns	ns
	Diámetro	Intermedio	ns	** O1; * O2	*** O1
		Terminal	ns	ns	* O2 O3
	Longitud	Intermedio	ns	*** O1; * O3	ns
		Terminal	ns	*** O2 O3	** O2; *** O3; * O4
	Superficie (área)	Intermedio	ns	*** O1	*** O1; * O2 O3
		Terminal	ns	*** O2 O3	** O2; *** O3; * O4
	Volumen	Intermedio	ns	*** O1; * O2	*** O1; ** O2; * O3
		Terminal	ns	*** O2 O3	*** O2 O3

5.1.2.4. Morfología de las espinas dendríticas en relación con la hiperfosforilación de la proteína tau

En vista de los resultados obtenidos en cuanto a la morfología neuronal en los tres grupos de estudio, se procedió al análisis de las espinas dendríticas a nivel de densidad y morfología de estas. Siguiendo el esquema empleado a la hora de analizar la morfología neuronal, se realizó el estudio de las dendritas apicales y basales por separado.

Morfología de las espinas dendríticas: dendrita apical principal

Se analizaron las espinas dendríticas presentes en la parte proximal (primeros 180 µm desde el soma) del tronco principal de la dendrita apical, dado que, por la técnica empleada, es la región proximal la que presenta un marcaje suficientemente intenso como para llevar a cabo el análisis y, además, es la que

muestra expresión de proteína tau hiperfosforilada en aquellas células T(AT8+). Cabe destacar que la presencia de marcaje AT8 en la dendrita apical principal, en caso de darse, no lo hace de igual manera en todas las neuronas analizadas, sino que la distancia (desde el soma) hasta la que el marcaje se hace visible varía desde unos pocos micrómetros a varias decenas de micras (10-180 μm). Como se detalla en el apartado de Materiales y Métodos, las espinas dendríticas de la dendrita apical principal se reconstruyeron tridimensionalmente permitiendo el estudio de variables morfológicas: longitud, área y volumen de las espinas, así como estudiar la densidad y distribución de estas a lo largo del tronco de la dendrita apical. Al igual que en el estudio de los árboles dendríticos, solo analizamos las espinas dendríticas comprendidas entre 0 y 180 μm desde el soma.

Con respecto a la densidad de espinas dendríticas, no se han encontrado diferencias significativas entre ninguno de los grupos (Figura 28; Tabla 12).

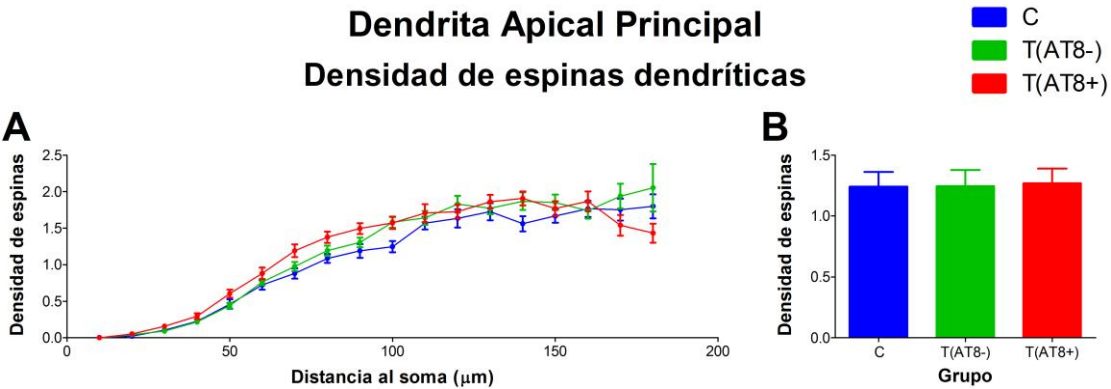


Figura 28| Gráficas que muestran la densidad de espinas dendríticas en la dendrita apical principal de las neuronas inyectadas de los grupos C (azul), T(AT8-) (verde) y T(AT8+) (rojo). (A) Distribución de los valores en función de la distancia al soma. (B) Media de los valores totales. Media \pm de. (Figura tomada de Regalado-Reyes et al., 2020).

Tabla 12| Significación estadística de los resultados mostrados en la figura 28.
*** $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.**

Densidad de espinas dendríticas en la dendrita apical principal. Análisis Sholl.			
Distancia al soma (μm)	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
100	*	ns	ns

En cuanto a la morfología de las espinas dendríticas, se encontraron diferencias significativas para las tres variables analizadas.

Comenzando por la longitud de las espinas dendríticas, encontramos un aumento significativo en los valores medios totales de los grupos T(AT8-) y T(AT8+) al compararlos con el grupo control (Figura 29 C; Tabla 13). Esta diferencia queda también reflejada cuando se analiza la distribución de las espinas en función de la distancia al soma, apareciendo la curva del grupo control por debajo de las curvas de los otros dos grupos, a pesar de seguir el mismo patrón (Figura 29 A; Tabla 13).

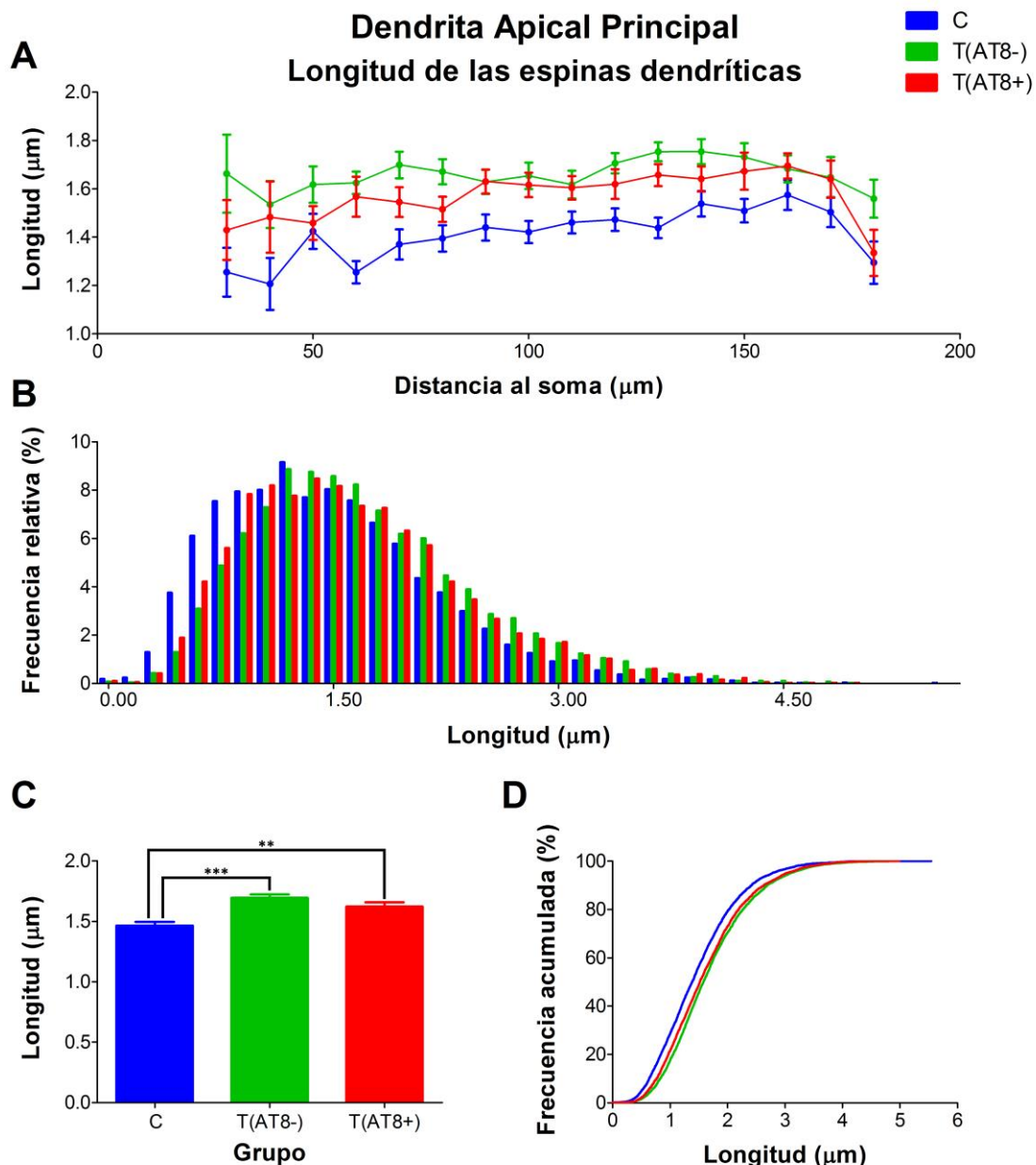


Figura 29| Gráficas que muestran la longitud de las espinas dendríticas en la dendrita apical principal de las neuronas inyectadas de los grupos control (azul), T(AT8-) (verde) y T(AT8+) (rojo). (A) Distribución de los valores en función de la distancia al soma. (B)

Datos organizados en forma de distribución de frecuencias relativas. (C) Media de los valores totales. (D) Datos organizados en forma de distribución de frecuencias acumuladas. Media \pm de. ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$. (Figura tomada de Regalado-Reyes et al., 2020).

Del mismo modo, al representar los valores en forma de distribución de frecuencias, comprobamos que el grupo control presenta mayores valores de frecuencia para las espinas de longitud menos y los grupos T(AT8-) y T(AT8+) muestran valores de frecuencia más elevados para las longitudes de espina mayores (Figura 29 B y D).

Tabla 13| Significación estadística de los resultados mostrados en la figura 29. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; * $p < 0,0001$.**

Longitud de las espinas dendríticas en la dendrita apical principal. Análisis Sholl.			
Distancia al soma (μm)	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
30	**	ns	ns
40	**	ns	ns
60	***	*	ns
70	**	ns	ns
80	*	ns	ns
130	**	ns	ns
Longitud de las espinas dendríticas en la dendrita apical principal. Media de los valores totales.			
	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
	***	**	ns

En lo que respecta al área de las espinas dendríticas, encontramos diferencias significativas en los valores medios totales del área, siendo estos significativamente más altos en los grupos T(AT8-) y T(AT8+) al compararlos con el grupo control (Figura 30 C; Tabla 14). Estas diferencias quedan también reflejadas cuando los datos se analizan en cuanto a su distribución según la distancia al soma y como una distribución de frecuencias, encontrando siempre valores de área menores en el grupo control comparado con los otros dos grupos (Figura 30 A, B y D; Tabla 14).

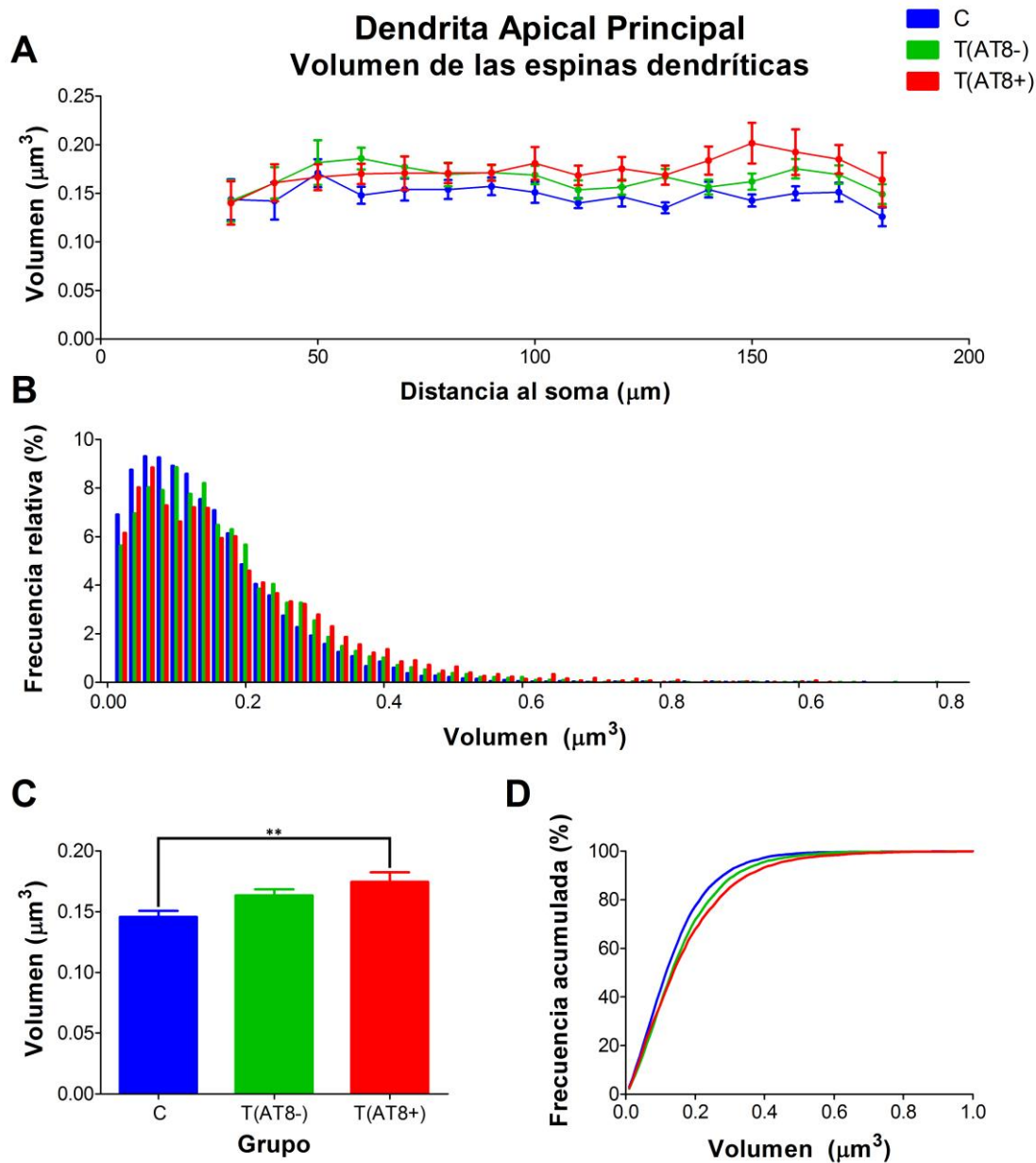


Figura 30| Gráficas que muestran el área de las espinas dendríticas en la dendrita apical principal de las neuronas inyectadas de los grupos control (azul), T(AT8-) (verde) y T(AT8+) (rojo). (A) Distribución de los valores en función de la distancia al soma. (B) Datos organizados en forma de distribución de frecuencias relativas. (C) Media de los valores totales. (D) Datos organizados en forma de distribución de frecuencias acumuladas. Media \pm de. ** $p<0,001$. (Figura tomada de Regalado-Reyes et al., 2020).

Tabla 14| Significación estadística de los resultados mostrados en la figura 30. * $p<0,05$; ** $p<0,001$; *** $p<0,0001$.

Área de las espinas dendríticas en la dendrita apical principal. Media de los valores totales.			
	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
	**	**	ns

Por último, en cuanto al volumen de las espinas dendríticas, encontramos valores medios totales significativamente mayores en el grupo T(AT8+) al compararlo con el grupo control (Figura 31 C; Tabla 15). Una vez más, estas diferencias se ven reflejadas cuando los datos se representan en función de la distancia al soma y como distribución de frecuencias (Figura 31 A, B y D; Tabla 15).

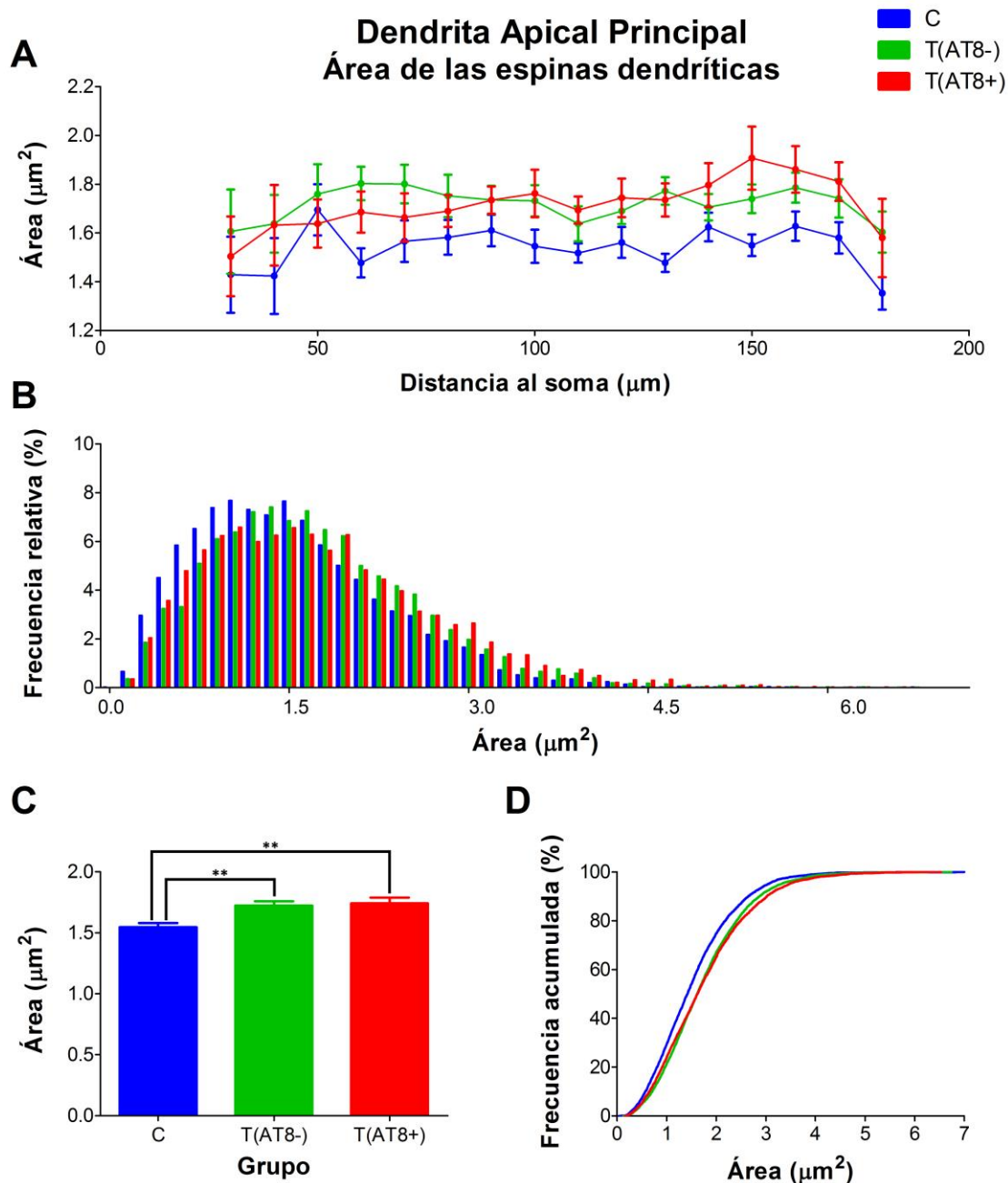


Figura 31| Gráficas que muestran el volumen de las espinas dendríticas en la dendrita apical principal de las neuronas inyectadas de los grupos control (azul), T(AT8-) (verde) y T(AT8+) (rojo). (A) Distribución de los valores en función de la distancia al soma. (B) Datos organizados en forma de distribución de frecuencias relativas. (C) Media de los

valores totales. (D) Datos organizados en forma de distribución de frecuencias acumuladas. Media \pm de. ** $p < 0,001$. (Figura tomada de Regalado-Reyes et al., 2020).

Tabla 15| Significación estadística de los resultados mostrados en la figura 31. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; * $p < 0,0001$.**

Volumen de las espinas dendríticas en la dendrita apical principal. Análisis Sholl.			
Distancia al soma (μm)	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
150	ns	*	ns
Volumen de las espinas dendríticas en la dendrita apical principal. Media de los valores totales.			
	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
	ns	**	ns

Además, puesto que la hiperfosforilación de la proteína tau se hace especialmente intensa en la zona más proximal de la dendrita apical principal, quisimos comprobar su efecto sobre la distancia con respecto al soma a la que comienzan a aparecer las espinas dendríticas. No encontramos diferencias significativas en este parámetro entre grupos, obteniendo unos valores de $32,26 \pm 8,835 \mu\text{m}$ en el grupo control, $34,55 \pm 9,712 \mu\text{m}$ en el grupo T(AT8-) y $30,77 \pm 7,961 \mu\text{m}$ en el grupo T(AT8+).

Morfología de las espinas dendríticas: dendritas basales

En lo que respecta a las dendritas basales, cabe destacar que se analizó la densidad y distribución de las espinas dendríticas tomando siempre una rama completa de cada una de las células incluidas en el estudio, incluyendo 25 células por grupo.

De manera similar a la dendrita apical principal, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la densidad de espinas dendríticas entre ninguno de los grupos en las dendritas basales (Figura 32). Además, al tratarse de ramas completas, se analizó la densidad de espinas dendríticas por dendrita, es decir, tomando la longitud total de la rama y calculando el promedio de densidad de espinas a lo largo de toda su longitud. No encontramos diferencias significativas entre ninguno de los grupos, obteniendo un valor de densidad media de $0,7872 \pm 0,1729$ en el grupo control; $0,7312 \pm 0,1487$ en el grupo T(AT8-); y $0,8156 \pm 0,2346$ en el grupo T(AT8+) (Datos expresados como media \pm de).

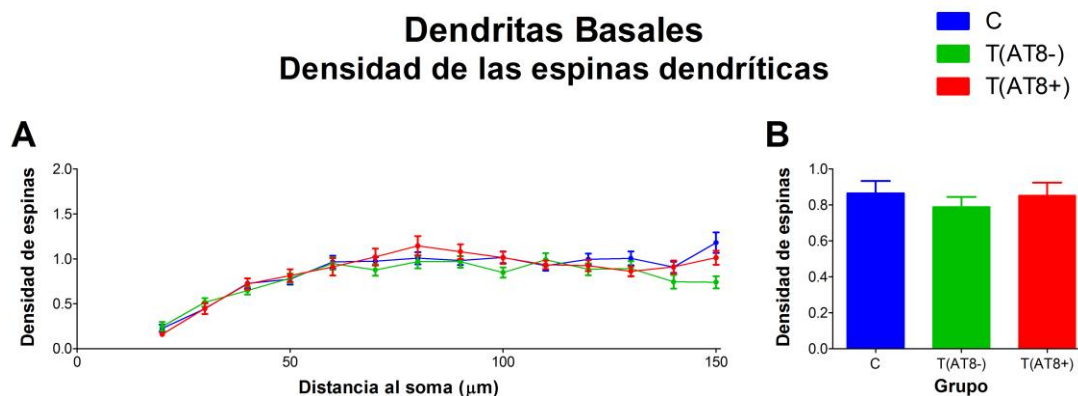


Figura 32| Gráficas que muestran la densidad de espinas dendríticas en una de las dendritas basales de las neuronas inyectadas de los grupos control (azul), T(AT8-) (verde) y T(AT8+) (rojo). (A) Distribución de los valores en función de la distancia al soma. (B) Media de los valores totales. (C) Datos organizados en forma de distribución de frecuencias acumuladas. Media \pm de. (Figura tomada de Regalado-Reyes et al., 2020).

Por otro lado, de la misma manera que se procedió con las dendritas apicales principales, se analizaron las variables morfológicas de longitud, área y volumen de las espinas dendríticas. En el caso de la longitud de las espinas, encontramos valores medios totales mayores en los grupos torpor, siendo la diferencia con respecto al grupo control significativa en el caso del grupo T(AT8-) (Figura 33 C; Tabla 16). Además, al analizar la distribución de los datos en función de la distancia al soma, encontramos un aumento significativo en los valores del grupo T(AT8-) a 30 y 50 μm cuando se compara con el grupo control y a 20 y 30 μm cuando se compara con el grupo T(AT8+) (Figura 33 A; Tabla 16). Estas diferencias quedan también reflejadas en los datos representados en forma de distribución de frecuencias relativas y acumuladas (Figura 33 B y D).

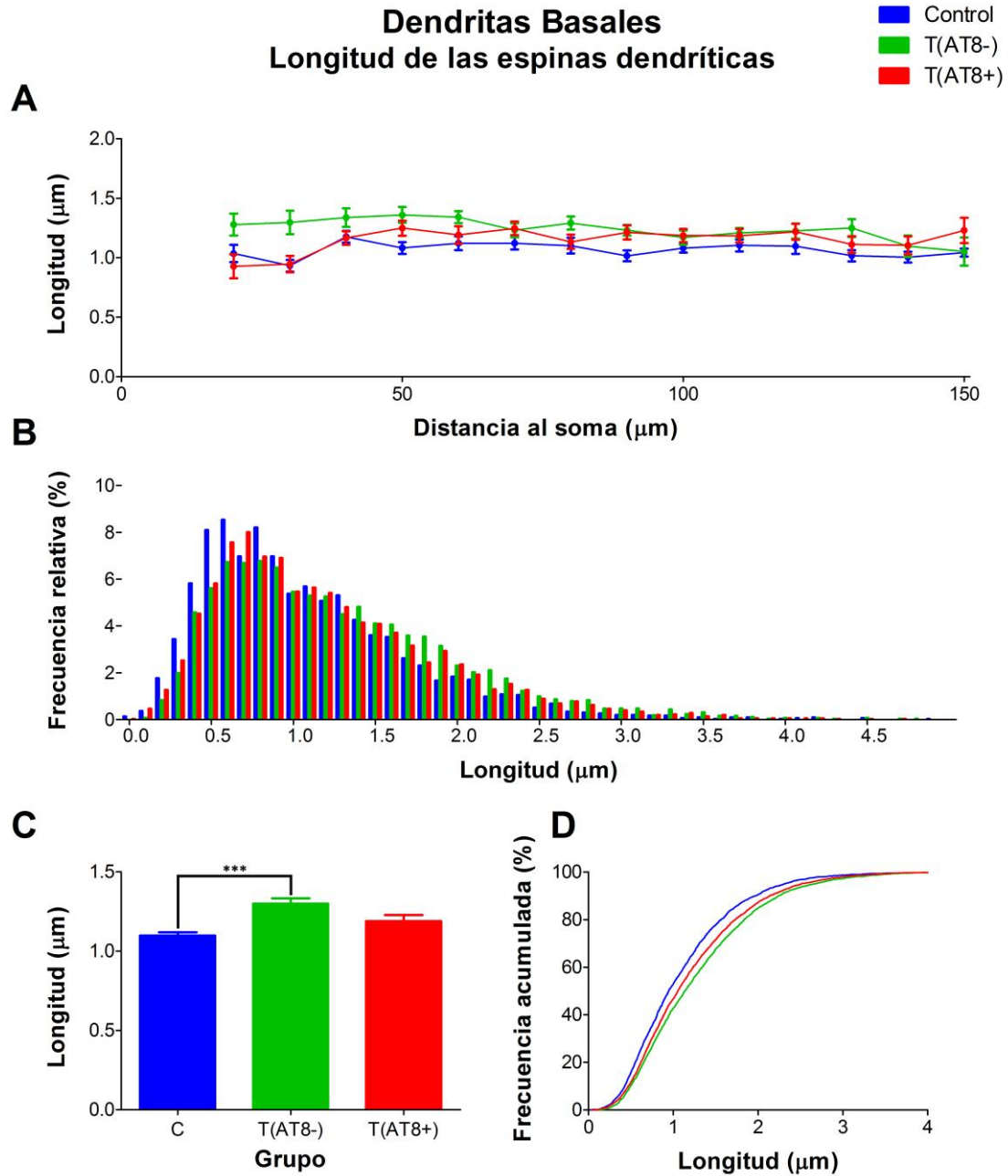


Figura 33| Gráficas que muestran la longitud de las espinas dendríticas en las dendritas basales principales de las neuronas inyectadas de los grupos control (azul), T(AT8-) (verde) y T(AT8+) (rojo). (A) Distribución de los valores en función de la distancia al soma. (B) Datos organizados en forma de distribución de frecuencias relativas. (C) Media de los valores totales. (D) Datos organizados en forma de distribución de frecuencias acumuladas. Media \pm de. *** $p < 0,0001$. (Figura tomada de Regalado-Reyes et al., 2020).

Tabla 16| Significación estadística de los resultados mostrados en la figura 33. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; * $p < 0,0001$.**

Longitud de las espinas dendríticas en las dendritas basales. Análisis Sholl.			
Distancia al soma (μm)	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
30	*	ns	*
Longitud de las espinas dendríticas en las dendritas basales. Media de los valores totales.			
	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
	***	ns	ns

En el caso del área de las espinas dendríticas de las dendritas basales, los grupos torpor mostraron valores totales medios significativamente mayores que el grupo control. Además, los valores en el grupo T(AT8-) fueron significativamente mayores que en el grupo T(AT8+) (Figura 34 C; Tabla 17). Al analizar la distribución de los valores del área en función de la distancia al soma, encontramos valores significativamente mayores en el grupo T(AT8-) en el rango entre 30 y 130 μm al compararse con el grupo control y entre 30 y 40 μm al compararse con el grupo T(AT8+) (Figura 34 A; Tabla 17). Además, estos resultados quedan reflejados al representar los datos en forma de histograma de frecuencias relativas y acumuladas (Figura 34 B y D).

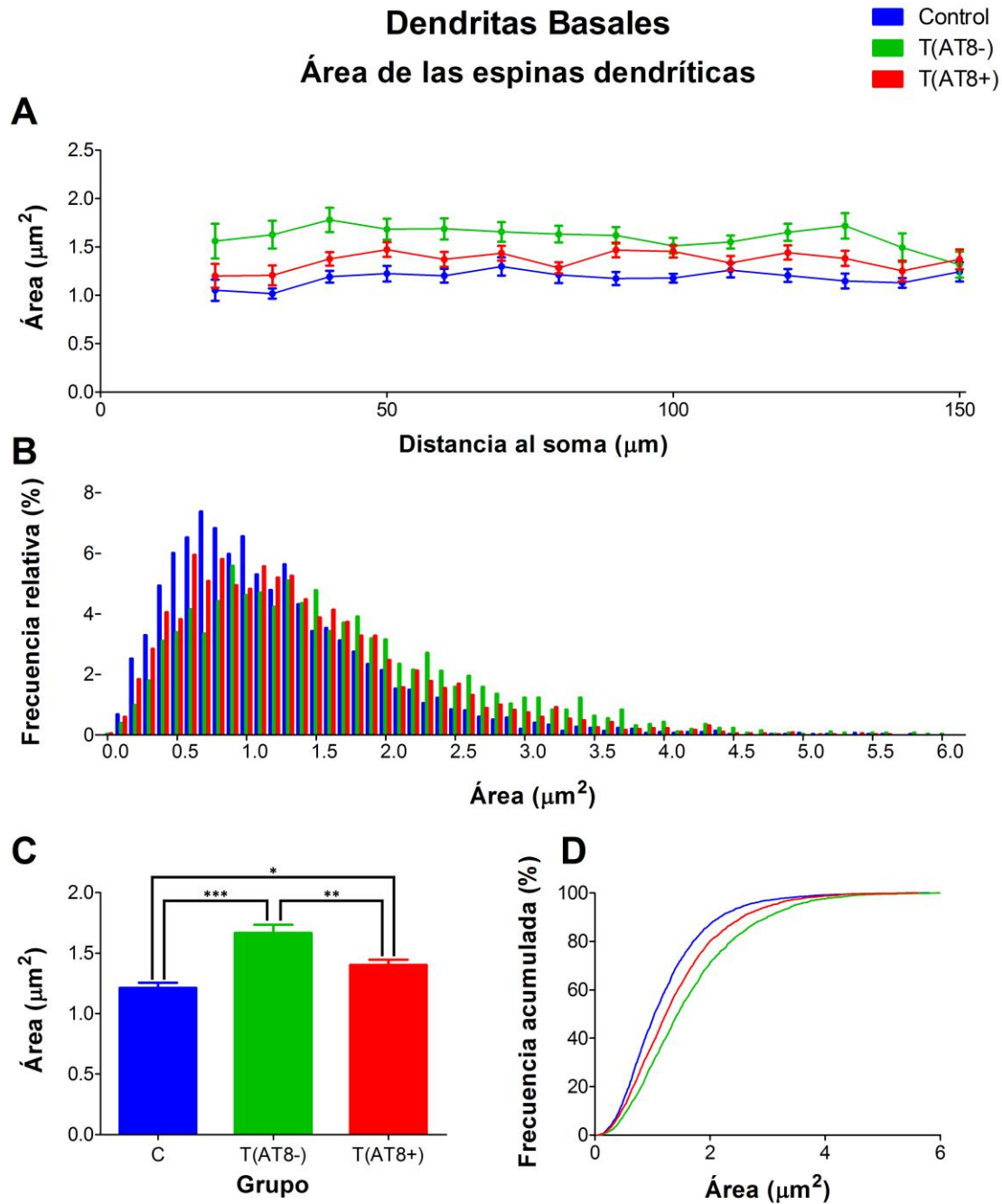


Figura 34| Gráficas que muestran el área de las espinas dendríticas en las dendritas basales principales de las neuronas inyectadas de los grupos control (azul), T(AT8-) (verde) y T(AT8+) (rojo). (A) Distribución de los valores en función de la distancia al soma. (B) Datos organizados en forma de distribución de frecuencias relativas. (C) Media de los valores totales. (D) Datos organizados en forma de distribución de frecuencias acumuladas. Media \pm de. ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$. (Figura tomada de Regalado-Reyes et al., 2020).

Tabla 17| Significación estadística de los resultados mostrados en la figura 34.
* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

Área de las espinas dendríticas en las dendritas basales. Análisis Sholl.			
Distancia al soma (μm)	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
20	***	ns	ns
30	**	ns	ns
Área de las espinas dendríticas en las dendritas basales. Media de los valores totales.			
	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
	***	*	**

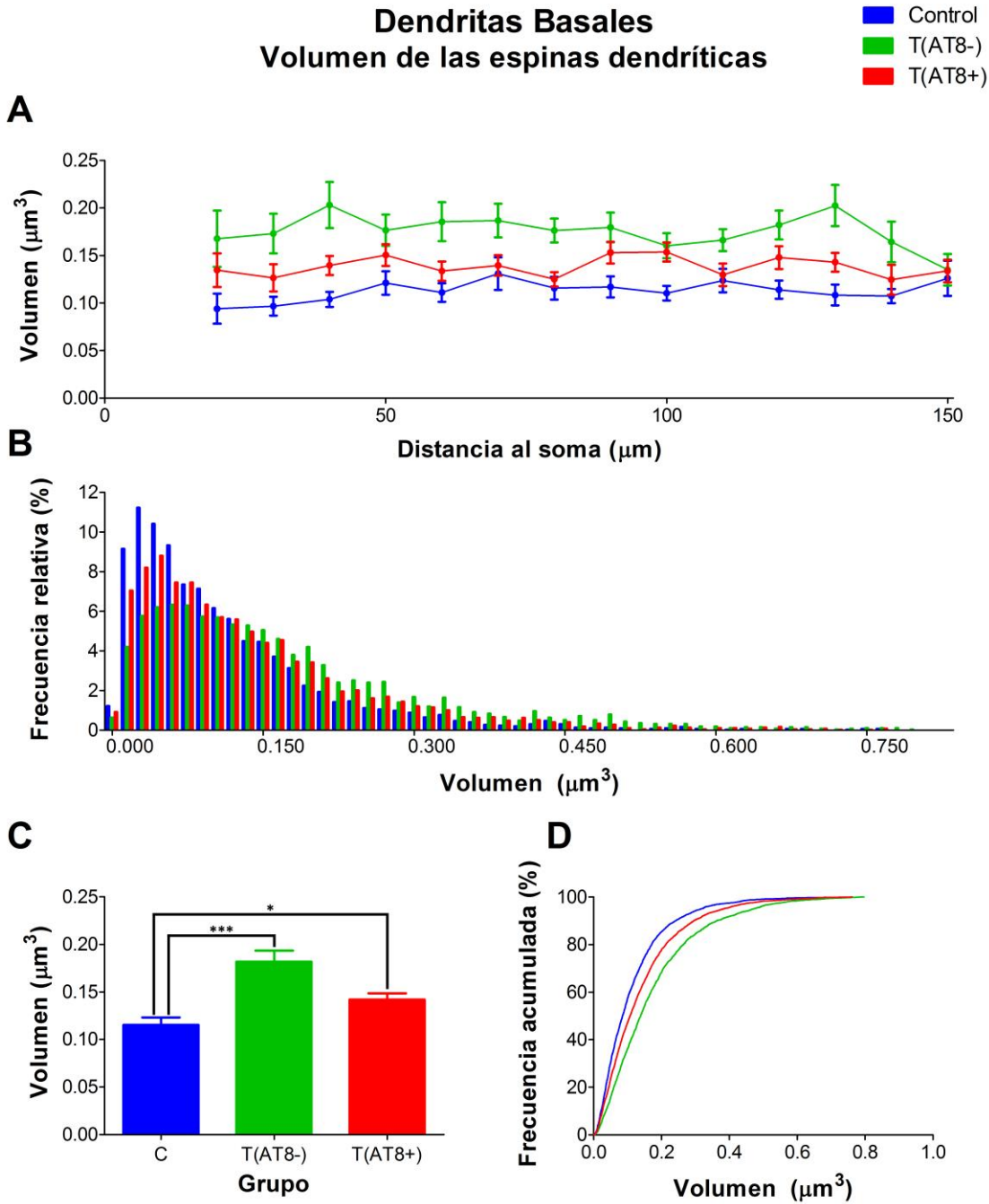


Figura 35| Gráficas que muestran el volumen de las espinas dendríticas en las dendritas basales principales de las neuronas inyectadas de los grupos control (azul), T(AT8-) (verde) y T(AT8+) (rojo). (A) Distribución de los valores en función de la distancia al soma. (B) Datos organizados en forma de distribución de frecuencias relativas. (C) Media de los valores totales. (D) Datos organizados en forma de distribución de frecuencias acumuladas. Media \pm de. ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$. (Figura tomada de Regalado-Reyes et al., 2020).

Por último, en cuanto al volumen de las espinas, los grupos torpor mostraron valores totales medios significativamente mayores que el grupo control (Figura 35 C; Tabla 18). Al analizar la distribución de los valores del volumen de las espinas en función de la distancia al soma, encontramos valores significativamente mayores en el grupo T(AT8-) en el rango entre 20 y 130 μm al compararse con el grupo control y a 40 μm al compararse con el grupo T(AT8+) (Figura 5 A; Tabla 18). Además, estos resultados quedan reflejados al representar los datos en forma de histograma de frecuencias relativas y acumuladas (Figura 35 B y D).

Al igual que en las dendritas apicales, se comparó la distancia con respecto al soma a la que comienzan a aparecer espinas dendríticas en las dendritas basales analizadas. No se encontraron diferencias significativas entre grupos, obteniendo unos valores de $18,82 \pm 6,002 \mu\text{m}$ en el grupo control, $20,59 \pm 6,587$ en el grupo T(AT8-) y $23,75 \pm 5,00$ en el grupo T(AT8+).

Tabla 18| Significación estadística de los resultados mostrados en la figura 35. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; * $p < 0,0001$.**

Volumen de las espinas dendríticas en las dendritas basales. Análisis Sholl.			
Distancia al soma (μm)	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
20	***	ns	ns
30	**	ns	ns
Volumen de las espinas dendríticas en las dendritas basales. Media de los valores totales.			
	C vs T(AT8-)	C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs T(AT8+)
	***	*	ns

Resumen de los resultados obtenidos con respecto a la morfología de las espinas dendríticas

La tabla 19 resume los resultados obtenidos con respecto al análisis de la densidad, distribución y morfología de las espinas dendríticas de células piramidales de la capa V de la corteza somatosensorial del hámster sirio.

Tabla 19| Resumen de los datos obtenidos con respecto a la morfología de las espinas dendríticas en el hámster sirio.

		C vs T(AT8-)		C vs T(AT8+)	T(AT8-) vs (AT8+)
Árbol Apical Espinass dendríticas	Densidad	total	ns	ns	ns
		Sholl	* 100 μ m	ns	ns
	Longitud	total	***	**	ns
		Sholl	*** 60 μ m; ** 30, 40, 70, 130 μ m; * 80 μ m	* 60 μ m	ns
	Área	total	**	**	ns
		Sholl	ns	ns	ns
	Volumen	total	ns	**	ns
		Sholl	ns	* 150 μ m	ns
Árbol Basal Espinass dendríticas	Densidad	total	ns	ns	ns
		Sholl	ns	ns	ns
	Longitud	total	***	ns	ns
		Sholl	*** 30 μ m; * 50 μ m	ns	** 20, 30 μ m
	Área	total	***	*	**
		Sholl	*** 30, 40 μ m; ** 20, 50, 60, 130 μ m; * 80, 120 μ m	ns	* 30, 40 μ m
	Volumen	total	***	*	ns
		Sholl	*** 40 μ m; ** 30, 60, 130 μ m; * 20, 80, 90, 120 μ m	ns	* 40 μ m

5.1.3. Estudio preliminar de la densidad de espinas dendríticas en la región CA3 del hipocampo

Empleando la misma metodología que para el análisis en neuronas de la corteza, se llevó a cabo un estudio preliminar en las regiones distales de las dendritas apicales oblicuas de las neuronas del área CA3 del hipocampo del hámster sirio. Nuestros resultados apuntan a que durante la hibernación del hámster sirio tiene lugar una disminución de la densidad de espinas dendríticas en las partes distales de las dendritas colaterales de las neuronas de CA3 (Figura 36).

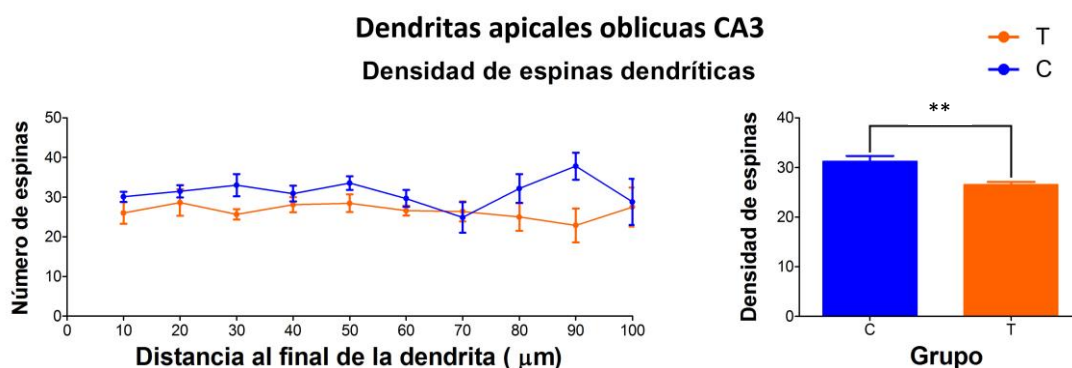


Figura 36| Gráficos que muestran la densidad de espinas dendríticas de la región distal de las dendritas analizadas en neuronas piramidales del área CA3 del hipocampo del hámster sirio expresadas en función de la distancia al soma (A) y como media de los valores totales (B). Media \pm de. (Figura tomada de Regalado-Reyes et al., 2020).

5.1.4. Efecto de la hibernación en la morfología de la microglía

En vista de los resultados obtenidos en cuanto al análisis de la morfología neuronal durante la hibernación del hámster sirio, así como para determinar si los cambios morfológicos hallados son exclusivos de la población neuronal, se llevaron a cabo inyecciones intracelulares en células de microglía en el hipocampo y la corteza somatosensorial del hámster sirio. El objetivo era estudiar su morfología en las distintas fases de la hibernación. Se combinó el marcaje mediante LY con el marcaje específico de microglía iba-1 y se reconstruyeron células individuales mediante el software Imaris, siguiendo el protocolo que se detalla en Materiales y Métodos (*vid.* Materiales y métodos apartado 3.6.2. *Imaris*).

Los resultados indican que, durante la fase de torpor, las prolongaciones de la microglía sufren una alteración en su grosor, haciéndose más finos en algunas regiones y mostrando engrosamientos y aparición de protuberancias en otras. Estas alteraciones son, probablemente, las responsables de la aparición de discontinuidades en el marcaje mediante iba-1 durante el torpor. Además, algunos de las prolongaciones que mostraban marcaje con LY (lo cual implica continuidad en la membrana ya que en caso contrario el fluoróforo no podría avanzar por el interior de las ramas y no habría marcaje), exhibían discontinuidad o fragmentación en el marcaje con iba-1 (Figura 37 D-F, J-L). Por otro lado, en la fase de eutermia, el marcaje con LY era continuo a lo largo de todas las prolongaciones de las células de microglía analizadas. Además, estas mostraban un diámetro

constante a lo largo de todas las ramificaciones y colocalizaban con el marcaje de iba-1 (Figura 37 A-C, G-I).

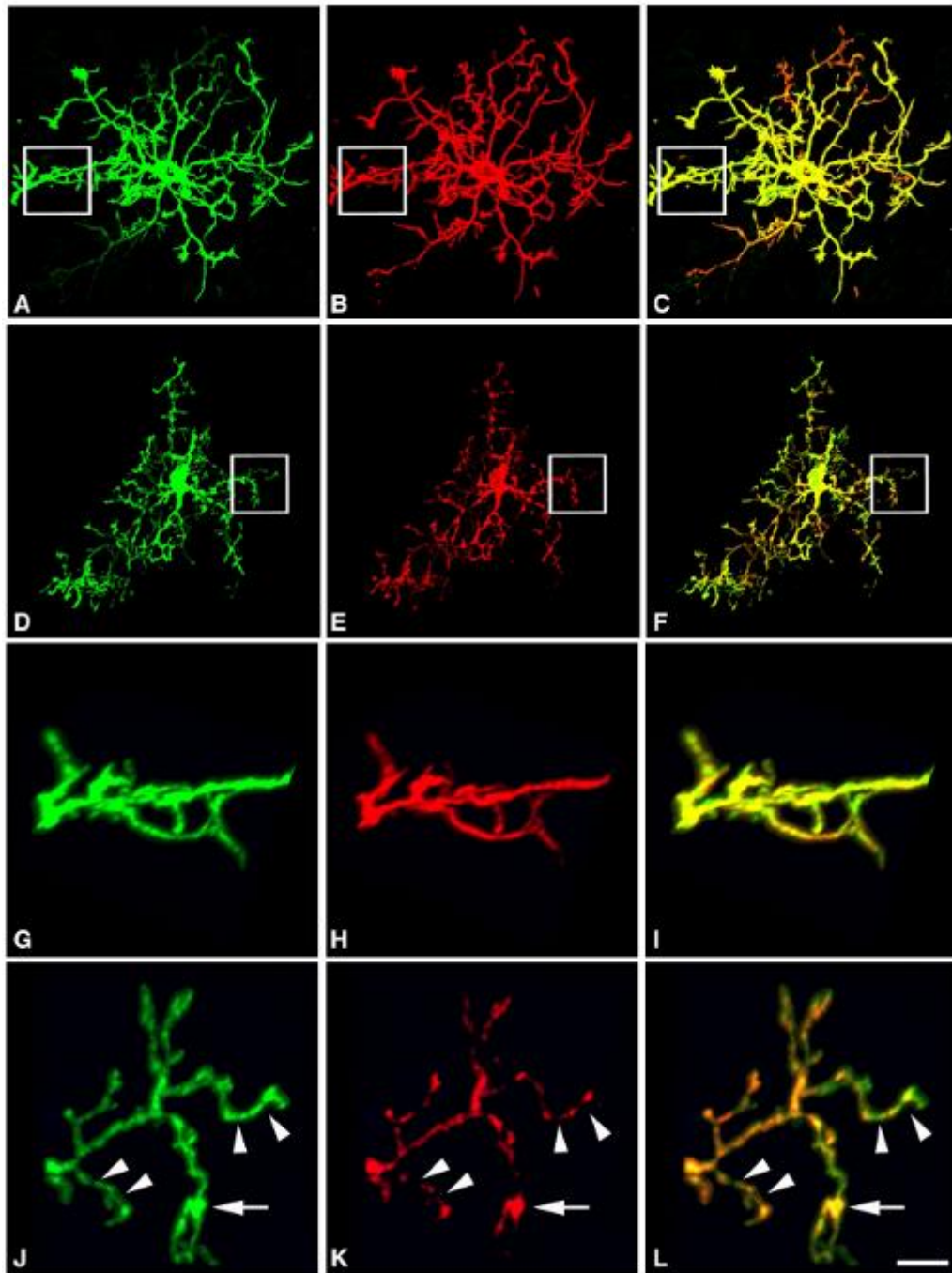


Figura 37| Ejemplos de proyecciones en z de fotomicrografías tridimensionales adquiridas mediante el microscopio confocal en las que se muestran las diferencias morfológicas del marcaje con iba-1 (rojo) y LY (verde) en células de microglía inyectadas con LY en el grupo control (A-C), ampliadas en G-I y en el grupo torpor (D-F), ampliadas en J-L. Las cabezas de flecha indican estrechamientos y las flechas completas indican protuberancias en las ramificaciones de las células en el grupo torpor. Barra de escala (en L): 3.5 μm en A-F y 12.5 μm en G-L. (Tomada de León-Espinosa *et al.*, 2018).

Estos resultados indican que la hibernación no solo afecta a la morfología de las neuronas, sino también al menos a un tipo de células gliales, la microglía. Además, dado que las células de microglía no expresan la proteína tau, los cambios descritos en esta tesis doctoral, no parecen estar directamente relacionados con los procesos de hiperfosforilación de tau (León-Espinosa *et al.*, 2018).

5.1.5. Estudio metabolómico en el hámster sirio en hibernación (colaboración con laboratorio de Coral Barbas)

Como se ha comentado en la introducción de la presente tesis, la hiperfosforilación de la proteína tau durante la hibernación del hámster sirio es un proceso reversible. Del mismo modo, se ha demostrado que los cambios morfológicos en neuronas y microglía también se restituyen al entrar en la fase de *arousal*. Sin embargo, los mecanismos involucrados en este fenómeno son desconocidos. Por ello, se estableció una colaboración el laboratorio de la Dra. Coral Barbas (CEMBIO (*Centre for Metabolomics and Bioanalysis*), Facultad de Farmacia, Universidad CEU San Pablo) en un estudio metabolómico realizado en el hámster sirio durante la hibernación.

Dadas las diferencias encontradas entre el hámster sirio y el humano en cuanto a los fenómenos de fosforilación de la proteína tau, destacando, entre otros, el hecho de que en el hámster sirio no se forman ovillos neurofibrilares, sino que la fosforilación de la proteína tau es reversible, resulta se podría teorizar que puedan deberse a diferencias en la expresión de metabolitos o enzimas, como las fosfatasas y las quinasas.

Así, en este el estudio metabolómico no dirigido en el cerebro del hámster sirio durante la hibernación se describen cambios significativos en 337 metabolitos al comparar el cerebro de los animales del grupo torpor con los animales del grupo control (sin hibernar). De entre estos, cabe destacar un gran número de aminoácidos, ácidos carboxílicos y dicarboxílicos, esfingolípidos, ácidos grasos, glicerolípidos y glicerofosfolípidos, entre otros. Estos cambios en el nivel de expresión de ciertos metabolitos apuntan a que los cambios, durante la hibernación, se centran en ciertas rutas metabólicas, incluyendo la síntesis proteica, el metabolismo de la metionina, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y el

ciclo de la urea entre otras. Además, describen un aumento, durante el torpor, de las ceramidas de más de 20 átomos de carbono, reflejando esto un aumento en la actividad de la proteína CerS2, asociada al proceso de generación de ovillos neurofibrilares, así como a los cambios estructurales del aparato de Golgi (Gonzalez-Riano *et al.*, 2019).

5.2. Humano

Como se ha detallado en los apartados anteriores, durante la hibernación del hámster sirio la proteína tau se fosforila en ciertos residuos de modo que se evite su agregación y formación de ovillos. Es posible que, en la enfermedad de Alzheimer, dado que la hiperfosforilación es constante, las neuronas no tengan la capacidad de revertir el proceso de formación de NFTs. De ser así, estudiar el proceso de fosforilación secuencial de la proteína tau puede ser relevante para comprender los mecanismos que desencadenan la formación de ovillos neurofibrilares en EA.

5.2.1. Estudio de la distribución y colocalización de la proteína tau hiperfosforilada reconocida por los anticuerpos AT100 y pS396

En el presente estudio se decidió analizar los patrones de expresión y localización de la proteína tau fosforilada en la Serina en posición 396, junto con la proteína tau hiperfosforilada en el epítipo AT100 (Thr212 y Ser214), con el fin de determinar la evolución de los procesos de fosforilación causantes de la alteración de la estructura de tau y que podrían promover la formación ovillos neurofibrilares. Todos los análisis se llevaron a cabo en pacientes con EA, en neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo, ya que es una de las regiones con mayor afectación (Braak & Del Tredici, 2006; Braak & Del Tredici, 2015).

Para el presente estudio, se emplearon muestras de 21 casos: 4 de ellos sin evidencia de deterioro cognitivo o demencia (IF8, IF9, AB5 y AB6) y 17 de ellos con EA (VK2, VK21, BCN11, BCN15, BCN4, BCN2, BCN6, BCN10, VK15, VK27, VK28, BCN1, BCN7, BCN9, BCN12, BCN13 and VK16). De acuerdo con los criterios clínicos y neuropatológicos, dichos casos fueron clasificados como se muestra en la Tabla 1, desde los estadios de Braak más bajos a los más altos.

Se realizaron tinciones con DAB con los anticuerpos AT100 y pS396 por separado, así como con los anticuerpos para la proteína A β y la proteína TDP43, con el fin de estudiar con mayor detalle los patrones de estos marcajes en los cerebros de pacientes con distinto estadio de Braak. Nuestros resultados indican que existe una mayor densidad de células marcadas con el anticuerpo pS396 (Figura 38 A y C) que con el marcador AT100 (Figura 38 B y D).

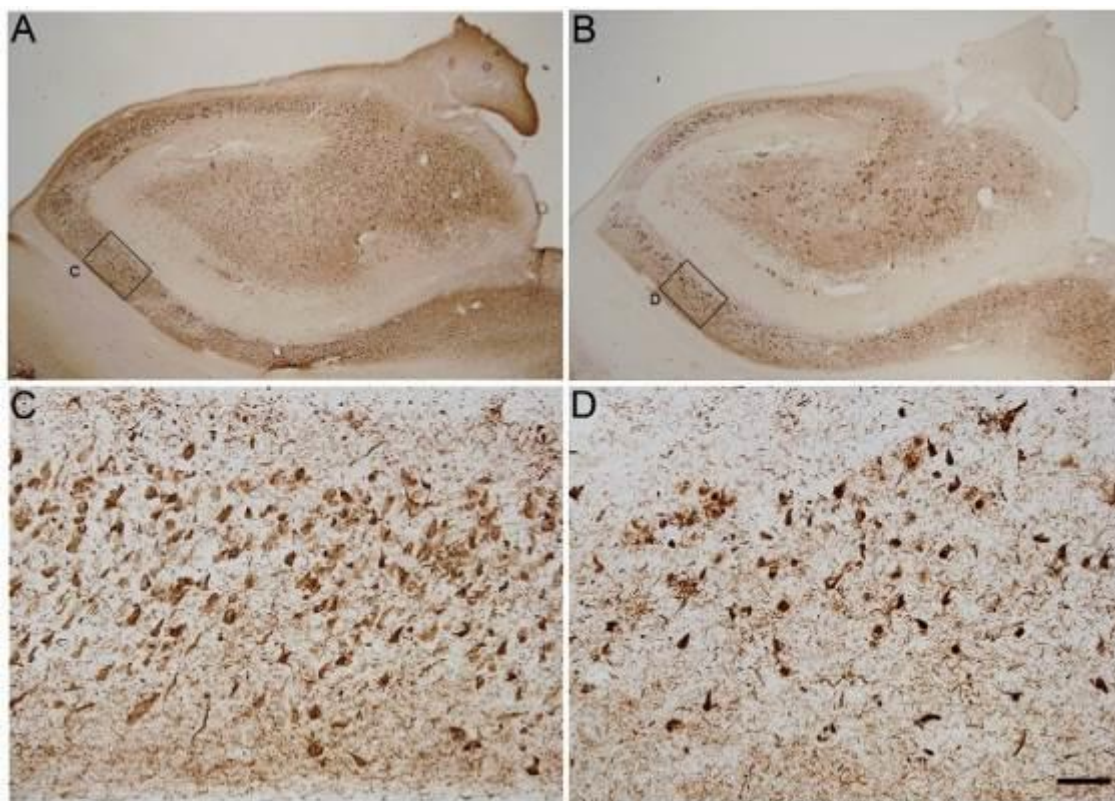


Figura 38| Fotomicrografías representativas del patrón de marcaje de la proteína tau hiperfosforilada que se obtiene mediante el uso de los anticuerpos pS396 (A y C) y AT100 (B y D) en dos secciones coronales adyacentes del hipocampo de uno de los casos diagnosticados con EA (BCN4). Las zonas marcadas con cuadrados en A y B se muestran a mayor aumento en C y D. Barra de escala: 1824 μ m en A y B y 114 μ m en C y D. (Figura tomada de Regalado-Reyes et al., 2019).

En base a la observación anterior, la cual apunta a diferencias en cuanto a la expresión de los distintos epítomos de proteína tau hiperfosforilada, se llevaron a cabo marcajes de inmunofluorescencia dobles y triples empleando los dos anticuerpos AT100 y pS396, así como un marcador de núcleos celulares denominado DRAQ5 (Figura 39).

Los resultados del estudio revelaron diferentes situaciones con respecto a la distinta fosforilación de la proteína tau en neuronas. Así, en la figura 39A se puede

ver un ejemplo de una neurona perteneciente a un caso con estadio de Braak I que muestra marcaje granular, tanto de AT100 como de pS396, visible en el soma celular, así como en los árboles basal y apical, incluyendo las dendritas colaterales de este último. Como se detalla en el apartado 2.1. *Enfermedad de Alzheimer (EA)* de la introducción, este tipo de marcaje se ha descrito como una forma de tau hiperfosforilada previa a la formación de ovillos neurofibrilares. Con respecto a las células que muestran este tipo de marcaje granular, encontramos que siempre presentan inmunorreactividad al anticuerpo AT100, mientras que el marcaje con pS396 puede estar, coexpresado con el marcaje de AT100 (Figura 39 A) o puede no estar, mostrándose las células marcadas únicamente con AT100 (Figura 39 B). Sin embargo, en ninguno de los casos analizados hemos encontrado células con marcaje granular positivo para pS396, pero no para AT100. Este resultado apoya la hipótesis ya descrita que defiende la hiperfosforilación de la proteína tau tiene lugar de forma secuencial, fosforilándose el epítipo de los aminoácidos Thr212 y la Ser214 antes que la Ser396 (Introducción apartado 2.1. *Enfermedad de Alzheimer*). Además del marcaje granular, encontramos células marcadas con AT100, que muestran también fibras o pequeños agregados marcados con pS396 que pueden suponer un estado previo a la formación de un ovillo neurofibrilar (pre-ovillos). Finalmente, con respecto a los ovillos neurofibrilares ya formados que se incluyeron en el análisis, encontramos todas las posibles combinaciones de tau hiperfosforilada, a saber: ovillos neurofibrilares positivos para el marcaje AT100, pero negativos para el marcaje pS396 (Figura 39D), ovillos neurofibrilares positivos para el marcaje pS396 pero negativos para el marcaje AT100 (Figura 39E) y ovillos neurofibrilares positivos para ambos marcajes (Figura 39B).

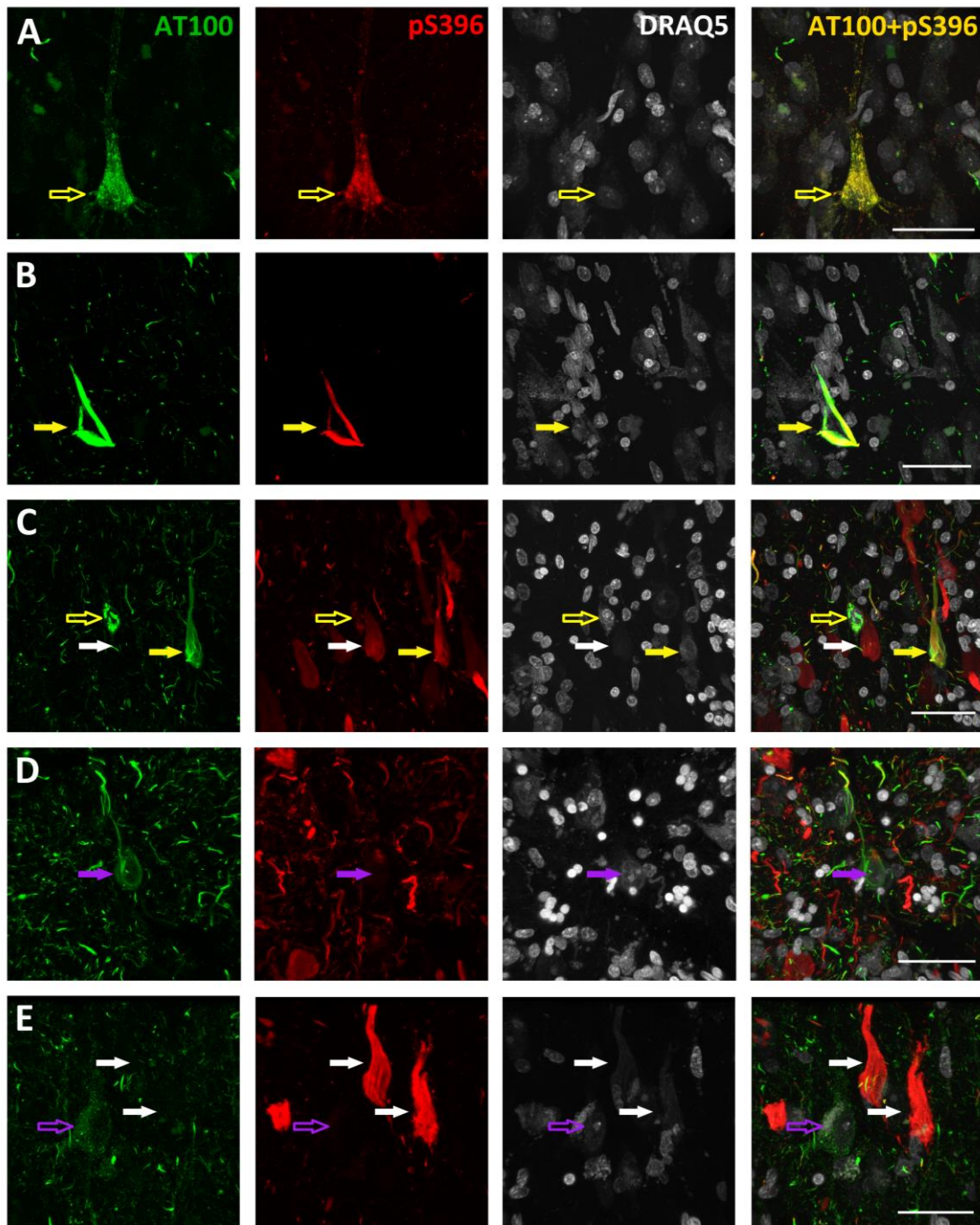


Figura 39| Fotomicrografías pertenecientes a distintos casos con estadio de Braak I (A), III (B) y VI (C, D y E) ilustrando los distintos patrones de marcaje con AT100 (verde) y pS396 (rojo) encontrados. Las flechas vacías muestran el marcaje granular, ya sea para el marcaje con AT100 (flechas moradas vacías) o para el marcaje con AT100 y pS396 (flechas amarillas vacías). Las flechas rellenas indican ovillos neurofibrilares, ya sean para marcaje con AT100 (flechas moradas moradas), para marcaje con pS396 (flechas blancas rellenas) o para el marcaje con AT100 y pS396 (flechas amarillas rellenas). Barras de escala: 40 μ m. (Figura tomada de Regalado-Reyes et al., 2019).

Cuando una neurona que contiene un ovillo neurofibrilar muere, el ovillo pasa a ser extracelular y a denominarse "ovillo fantasma". Quisimos estudiar, en

base al marcaje nuclear con DRAQ5, la integridad de aquellas neuronas que presentaban proteína tau hiperfosforilada. La morfología nuclear era aparentemente normal en todas las células con marcaje granular, ya fuesen células positivas para AT100 o positivas para AT100 y pS396. En contraposición, solo encontramos "ovillos fantasmas" (ausencia de núcleo) en aquellas células con ovillo neurofibrilar positivo para pS396, pero negativo para AT100. Por otro lado, aquellas neuronas con ovillo neurofibrilar marcado con AT100 o con AT100 y pS396 a la vez, conservaban un núcleo definido. Sin embargo, cuando el ovillo neurofibrilar era pS396 y solo encontramos algunas fibrillas AT100 positivas, no encontramos núcleo viable. Por lo tanto, la presencia de un núcleo definido parece depender de los elementos inmunoreactivos AT100 y pS396.

Una vez caracterizados los tipos de ovillo tanto de AT100 como de pS396, procedimos a evaluar las ratios y la colocalización entre ambos marcadores, comparando aquellos casos con bajo estadio de Braak (I-III) con aquellos con elevado estadio de Braak (IV-VI). Nuestros resultados indican que la progresión de la patología de tau correlaciona de manera inversa con la ratio AT100/pS396, es decir, aquellos casos con menor estadio de Braak exhiben una ratio AT100/pS396 significativamente mayor que aquellos casos con mayor estadio de Braak (Figura ZZ-A). Nuestros resultados también muestran que en los casos con menor estadio de Braak, la proporción de marcaje con AT100 es mayor a la del marcaje con pS396. A la hora de analizar la ratio o porcentaje de colocalización, aparece también una correlación inversa: menores estadios de Braak muestran significativamente mayores ratios de colocalización. En concreto, en los casos de Braak IV-VI aparece un 30,8% de colocalización mientras que los casos de Braak I-III muestran un 74,8% de colocalización (Figura 40).

Además, puesto que la acumulación de la proteína TDP43 se asocia con deterioro cognitivo y demencia, se determinó la relación entre TDP43 y la progresión de la enfermedad de Alzheimer (Tabla 22). Nuestros resultados confirman otros resultados obtenidos anteriormente en los que se indica que, en los casos con EA avanzada (Braak V-VI), las inclusiones de TDP43 en el citoplasma se encuentran en alrededor de un 75% de los casos.

Finalmente, se analizó el número de placas de A β en la región de CA1 del hipocampo de cada uno de los casos analizados y, como se esperaba, correlaciona de manera directa con la severidad de la patología (Figura 40; Tabla 22).

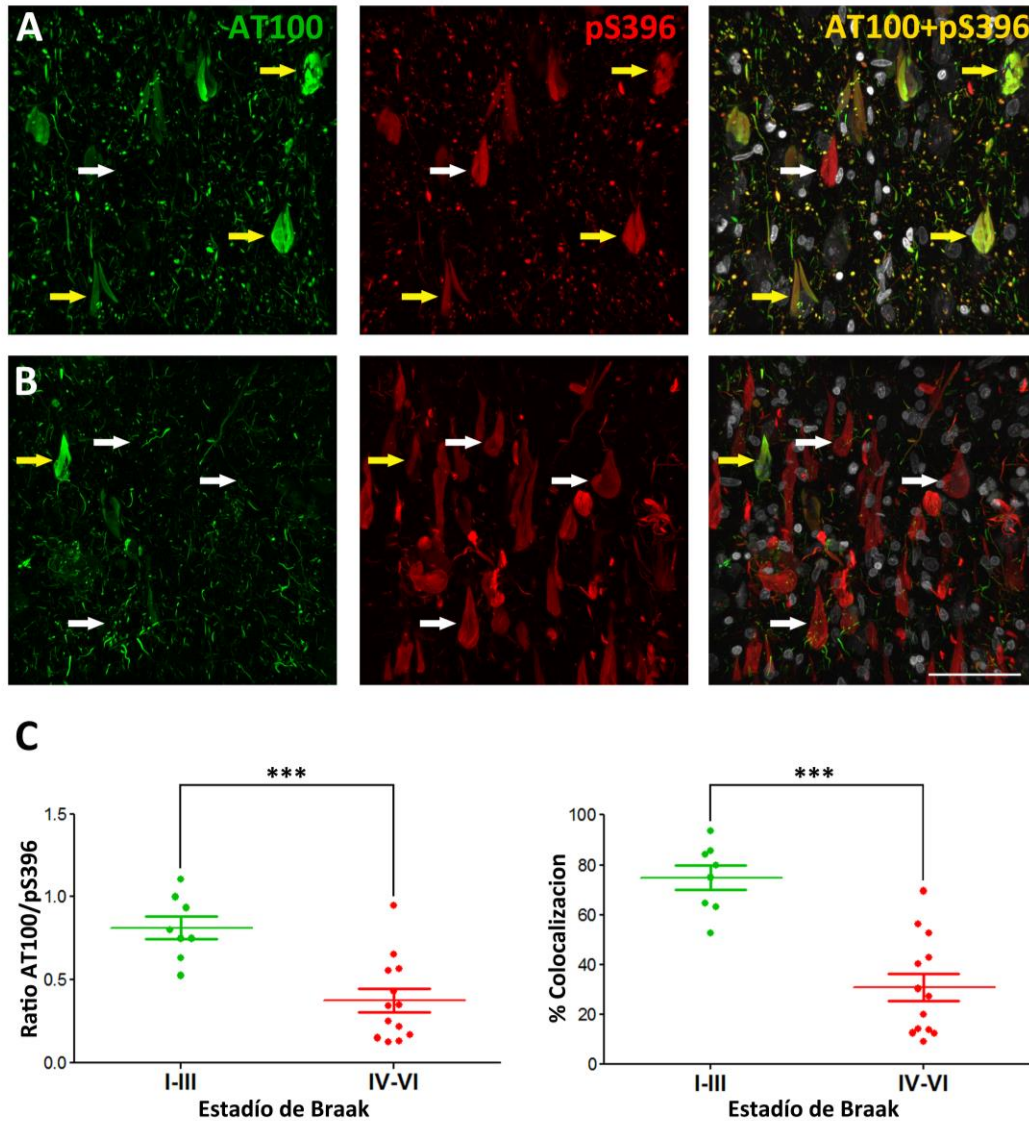


Figura 40| Fotomicrografías representativas mostrando los patrones de marcaje con AT100 y pS396 en uno de los casos con bajo estadio de Braak (A) o elevado estadio de Braak (B). Las flechas blancas indican ejemplos de neuronas en la que no se observa colocalización de ambos marcajes mientras que las flechas amarillas indican neuronas con ambos marcajes. (C) Histogramas que muestran la ratio de marcaje AT100/pS396 (izquierda) y el porcentaje de colocalización (derecha) teniendo en cuenta todos los casos analizados, divididos en dos grupos: bajo estadio de Braak (verde) y elevado estadio de Braak (rojo). Diferencias estadísticamente significativas según la prueba t de Student para ambos análisis. (media±SD). *** $p < 0,0005$. Barra de escala: 60 μm . (Figura tomada de Regalado-Reyes et al., 2019).

Tabla 20| Se muestra el número de células positivas para el marcaje AT100 y células positivas para el marcaje pS396 en cada caso junto con el volumen analizado, la ratio AT100/pS396 y el porcentaje de colocalización. Además, se muestra el número de placas β -amiloide por mm² así como la presencia o no de inclusiones TDP43 positivas en el citoplasma. -: no disponible.

Casos	Estadio Braak	Estadio CERAD	N de céls. AT100	N de céls. pS396	Volumen analizado (mm ³)	Ratio AT100/pS396	% de colocalización	N de placas A β /mm ²	Inclusiones TDP43 en citoplasma
IF9	I	Ninguno	3	4	0.054	0.75	75	0	NO
VK2	II	A	29	31	0.136	0.93	933.5	-	NO
IF8	III	A	12	16	0.067	0.75	64.7	0	NO
VK21	III	Ninguno	36	57	0.119	0.63	63.1	1.01	NO
BCN11	III	Ninguno	20	25	0.102	0.8	80	0	-
BCN15	III	Ninguno	31	28	0.153	1.1	84.3	0	NO
AB5	III	Ninguno	13	13	0.067	1	85.7	0	NO
AB6	III	A	10	19	0.071	0.53	52.6	2.03	NO
BCN4	IV	B	81	231	0.0119	0.35	27.3	4.61	NO
BCN2	V	C	43	76	0.054	0.56	52.5	8.59	-
BCN6	V	C	27	124	0.119	0.22	19.8	5.84	SI
BCN10	V	C	33	96	0.102	0.34	30.3	23.11	SI
VK15	V	C	38	40	0.102	0.95	69.5	-	-
VK27	V	B	30	116	0.119	0.26	14	22.96	NO
VK28	V	C	67	156	0.119	0.43	42.9	56.47	SI
BCN1	VI	C	41	74	0.102	0.55	40.2	19.53	SI
BCN7	VI	C	27	140	0.102	0.17	12.3	6.18	-
BCN9	VI	C	4	32	0.102	0.12	12.5	9.35	-
BCN12	VI	C	22	169	0.119	0.13	9.1	40.37	SI
BCN13	VI	C	65	99	0.085	0.65	56.2	7.27	SI
VK16	VI	C	37	246	0.102	0.15	13.6	10.49	SI

6. Discusión

La presente tesis doctoral aporta nuevos resultados e hipótesis en relación con el papel que podría jugar la proteína tau, tanto en la fisiología del hámster sirio en hibernación como en una situación patológica como sería la enfermedad de Alzheimer. Se ha llevado a cabo un estudio en profundidad de los efectos de la hiperfosforilación de la proteína tau sobre la morfología de las neuronas piramidales de la capa V de la corteza cerebral del hámster sirio, obteniendo una serie de resultados que, en conjunto, apuntan a un efecto específico de la hiperfosforilación de tau sobre algunas variables de morfología neuronal, como el diámetro y volumen de las dendritas basales o la complejidad de las dendritas apicales, pero no sobre otras como la densidad o morfología de las espinas dendríticas. El modelo del hámster sirio durante la hibernación puede ayudar a entender mejor los mecanismos de desencadenan la hiperfosforilación de la proteína tau. Dado que esos procesos son reversibles y no provocan daño neuronal, la búsqueda de los elementos que participan en este proceso, mediante estudios como el estudio de metabolómica incluido en la presente tesis, podría conducir a encontrar nuevas dianas neuroprotectoras útiles para tratamiento de la taupatías como la enfermedad de Alzheimer.

Además, el estudio de los patrones de fosforilación de la proteína tau y su distribución en muestras humanas de pacientes con EA parece apoyar la existencia de un patrón temporal en cuanto a la fosforilación de la proteína tau durante el progreso de la EA, hallando una mayor proporción de neuronas marcadas mediante el anticuerpo AT100 con respecto a las marcadas mediante el anticuerpo pS396, así como un menor número de iNFTs y eNFTs en aquellos pacientes con menor estadio de Braak.

Juntos, estos resultados ofrecen un avance en el conocimiento y comprensión de los fenómenos de hiperfosforilación de la proteína tau, uno de los elementos que caracterizan patologías tan prevalentes como la EA.

6.1. *La hibernación en el hámster sirio como modelo para estudiar los procesos de fosforilación y desfosforilación de la proteína tau*

Como se ha expuesto en numerosas ocasiones a lo largo de la presente tesis doctoral, durante la hibernación del hámster sirio, algunas subpoblaciones neuronales son más propensas a la expresión de proteína tau hiperfosforilada que otras. Aprovechando este proceso fisiológico, hemos podido llevar a cabo un análisis morfológico comparativo de neuronas de capa Va de la corteza somatosensorial del hámster sirio que expresan proteína tau hiperfosforilada (AT8+) y neuronas en las que no se detecta dicha proteína hiperfosforilada (AT8-).

Es importante destacar que, en este estudio, solo hemos evaluado la presencia de proteína tau hiperfosforilada mediante el anticuerpo AT8, que detecta la fosforilación en los aminoácidos serina 202 y treonina 205, por lo que no podemos descartar que aquellas células que incluimos dentro del grupo T(AT8-) pudieran contener proteína tau fosforilada en otros residuos. De hecho, Stieler y sus colaboradores demostraron en un estudio realizado en diversos animales hibernantes, entre los que cabe destacar el hámster sirio y la ardilla terrestre, — mediante *Western blot*— un aumento de proteína tau hiperfosforilada durante la fase de torpor empleando distintos anticuerpos como AT8 (S202/T205), AT100 (T212/S214/T217), AT180 (T231/S235) y PHF1 (S396/S404) (Stieler *et al.*, 2011). Lamentablemente, a excepción de AT8, dichos anticuerpos no muestran marcaje mediante técnicas de inmunohistoquímica en el tejido cerebral del hámster sirio. Los inmunógenos usados para elaborar dichos anticuerpos tienen procedencia humana y, aunque de forma teórica los sitios de reconocimiento también están presentes en otras especies como el hámster sirio, puede haber diferencias con respecto a las conformaciones adoptadas por la proteína tau que impidan una unión adecuada. En la técnica de *Western blot*, las proteínas están desnaturalizadas, lo que puede favorecer una unión estable anticuerpo-proteína. A pesar de las diferencias entre la proteína tau humana y la del hámster sirio aquí mencionadas así como las descritas por León-Espinosa y colaboradores en su estudio publicado en 2013 (León-Espinosa *et al.*, 2013), sus similitudes confieren un gran valor a este estudio y sus resultados, contribuyendo a la mejor

comprensión de los fenómenos de fosforilación de la proteína tau asociados a patologías como la EA.

Con respecto a la hiperfosforilación de la proteína tau durante la hibernación, el marcaje de tejido cerebral de hámster sirio en hibernación empleando el anticuerpo AT8 reveló una distribución heterogénea de la expresión de la proteína tau hiperfosforilada, más abundante en áreas como la corteza o el hilus del hipocampo (Arendt *et al.*, 2003). En concreto, la hiperfosforilación de tau es especialmente intensa en una subpoblación de neuronas piramidales de la capa V de la corteza y en las neuronas de CA3 y del hilus del hipocampo (Arendt *et al.*, 2003; Antón-Fernández *et al.*, 2015). En relación con esto, Bullmann y sus colaboradores proponen la hiperfosforilación de la proteína tau como uno de los posibles elementos implicados en las alteraciones de la morfología neuronal que describen (Bullmann *et al.*, 2016). El marcaje de tau hiperfosforilado resultó ser más intenso y abundante en las dendritas apicales principales y el soma celular, pero no se encontró en las dendritas basales, ni tampoco en las dendritas apicales oblicuas o el axón.

Así, resulta de especial interés el hecho de que, en algunas neuronas, a pesar de no encontrar marcaje en el soma celular ni la parte proximal de la dendrita apical, el marcaje con AT8 sí que se hace visible en regiones distales de la dendrita apical (Figura 41). Además, con respecto al marcaje de AT8 en las regiones superficiales de la corteza, se observan agrupaciones de dendritas apicales en forma de haz, que se intercalan con franjas con menor o casi ninguna dendrita apical marcada (Figura 43).

Este tipo de agrupaciones recuerda a una disposición columnar como la que propuso Mountcastle (Mountcastle, 1997, 2003). Este científico propuso dos tipos de organización vertical: macrocolumnar y microcolumnar. La macrocolumna es la unidad básica de procesamiento cortical de información y consiste en un cilindro de tejido cortical que varía de acuerdo con lo que se extiendan las fibras aferentes individuales que llegan a la corteza (de 300 a 600 μm , dependiendo del área cortical y/o la especie). Esta macrocolumna, que generalmente se denomina simplemente columna, sería equivalente a la unidad cortical elemental de operación de Lorente de Nó (DeFelipe, 2005b). La minicolumna es la subunidad

modular básica en la corteza, representando la unidad funcional de organización cortical más pequeña; el ensamblaje de varias minicolumnas constituye una macrocolumna. Estas minicolumnas están formadas por un grupo de células interconectadas y orientadas verticalmente, que están contenidas en un cilindro vertical de tejido con un diámetro aproximado de 25-50 μm (dependiendo del área cortical y/o la especie). De este modo, las agrupaciones de dendritas apicales marcadas con AT8 en la corteza del hámster sirio que se repiten a lo largo de toda la corteza cerebral, se asemejan a la organización de la neocorteza en minicolumnas (Figura 42). La mayor parte de estas dendritas marcadas con AT8 visibles en las capas superficiales de la corteza pertenecen al tronco principal de las dendritas apicales de las neuronas de la capa V, que ascienden hacia la capa I de la corteza formando módulos columnares. La vía de comunicación entre las capas corticales II-III y V es una de las mejor descritas a nivel de circuitos corticales (Harris and Shepherd, 2015). Puesto que, en base a nuestros resultados, existen modificaciones en los árboles dendríticos apicales durante la hibernación, especialmente en aquellas neuronas en las que aparece proteína tau hiperfosforilada, proponemos que esta modificación de la proteína tau pudiera tener un papel importante en la desconexión o alteración de la conectividad de las minicolumnas durante la hibernación, reduciendo la actividad cerebral.

Es importante destacar que los axones de las células de la capa Va de la corteza cerebral proyectan a través de los hemisferios hacia el cuerpo calloso y otras áreas corticales (Ramaswamy and Markram, 2015). Además, se ha descrito que los núcleos talámicos de segundo orden proyectan a dicha capa principalmente (Petreanu *et al.*, 2009; Wimmer *et al.*, 2010). El neurotransmisor acetilcolina, entre otros, es esencial para el funcionamiento normal del sistema nervioso, modulando, sobre todo, los circuitos talamocorticales, implicados en un gran número de funciones, como por ejemplo el despertar de la hibernación (Buzsaki *et al.*, 1988; Détári, 2000; Szymusiak, Alam and McGinty, 2000; Goard and Dan, 2009). En base a esto, podríamos hipotetizar que la distribución de la hiperfosforilación de la proteína tau de una forma similar a las minicolumnas de la corteza podría tener cierta relación con la regulación, a nivel talámico, de las fases de la hibernación, frenando la actividad durante la fase de torpor y permitiendo el despertar.

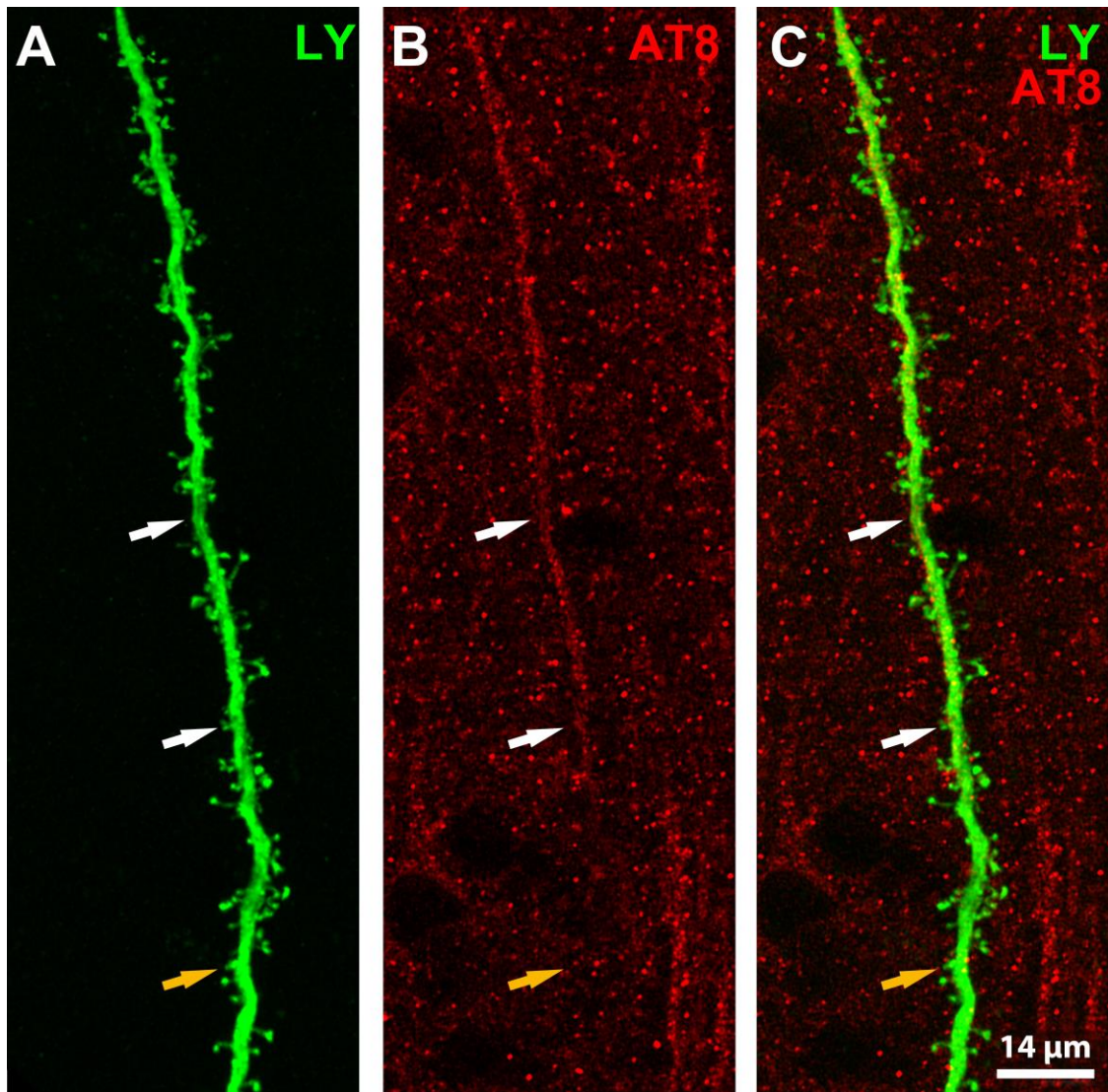


Figura 41| Fotomicrografías obtenidas mediante microscopia confocal de una región distal perteneciente a una dendrita apical de una neurona piramidal de la capa V del hámster sirio inyectada intracelularmente con LY (verde) y que ha sido marcada mediante el anticuerpo AT8 (rojo). Se observa como el marcaje con AT8 no es visible en la parte más proximal de dicha dendrita (flecha amarilla) pero comienza a hacerse evidente en las partes más distales (flechas blancas). Barra de escala (en C): 14 μ m.

Se ha propuesto que una de las posibles funciones del agrupamiento de las dendríticas podría ser el establecimiento de patrones de conectividad particulares con inputs aferentes comunes (DeFelipe, 2005). Puesto que las dendritas apicales de las neuronas piramidales establecen conexiones tanto excitatorias (principalmente) como inhibitorias (DeFelipe and Fariñas, 1992), las agrupaciones dendríticas podrían representar pequeñas regiones distribuidas regularmente en las que se concentran las dianas postsinápticas para las conexiones mencionadas. Además, conforme las dendritas apicales ascienden por la corteza, emiten ramas

oblicuas y, por lo tanto, en cada agrupación dendrítica tendría lugar un solapamiento de dichas ramificaciones de las dendritas apicales. Por lo tanto, se ha propuesto que esta distribución anatómica tan particular podría servir para conectar a las neuronas con axones que discurren a cierta distancia de estas, pero preservar así la precisión espacial (DeFelipe, 2005b; Regalado-Reyes *et al.*, 2020). En otras palabras, los agrupamientos dendríticos podrían servir para conectar los axones que llevan el input con puntos concretos y muy localizados de la corteza (la agrupación dendrítica), pero también con un área algo mayor y menos localizada (las dendritas apicales oblicuas pertenecientes a la agrupación dendrítica) (DeFelipe, 2005b).

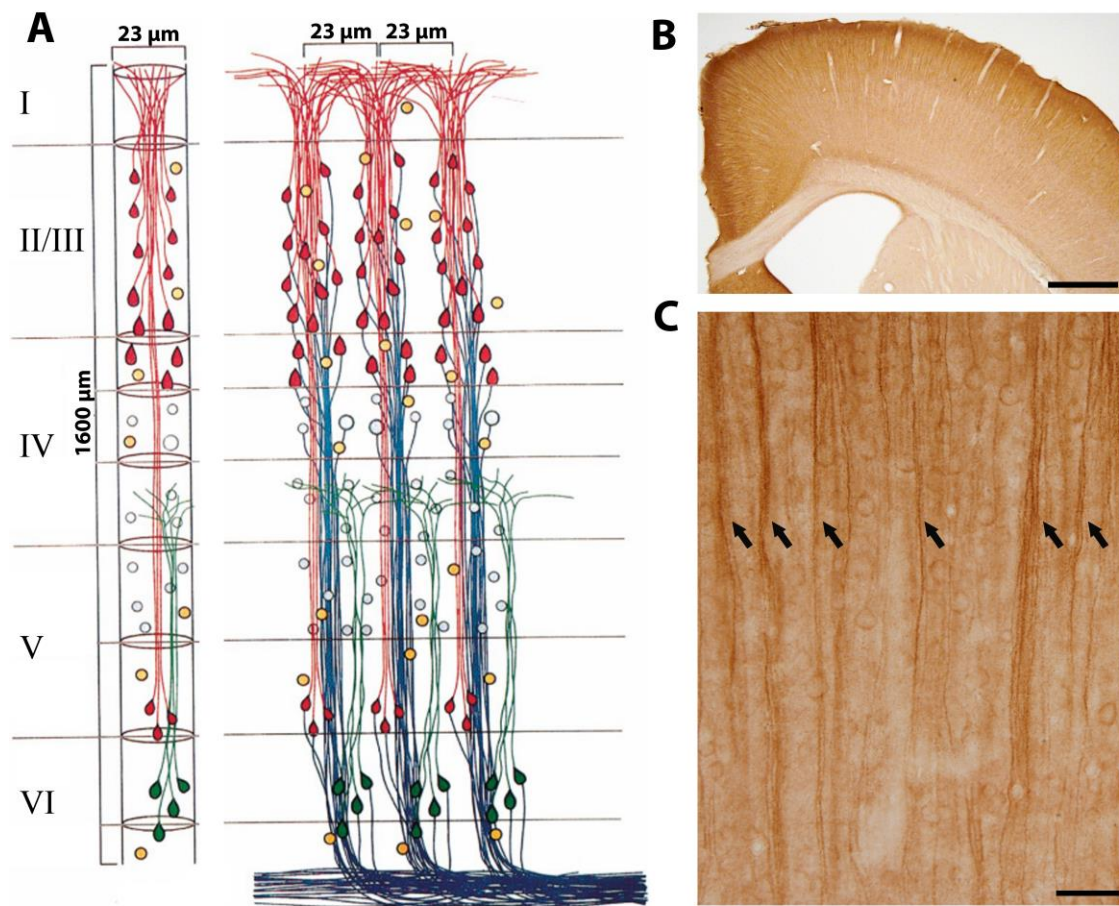


Figura 42| (A) Ilustración modificada de Mountcastle, 1997 en la que se muestran las minicolumnas corticales (Mountcastle, 1997). (B-C) Imágenes de una sección cerebral del hámster sirio marcadas empleando la técnica de DAB con el anticuerpo AT8 en las que se hacen visibles las agrupaciones de dendritas apicales AT8ir (marcadas con flechas en B). Barras de escala: 750 μm en B y 75 μm en C.

Otra posible función para las agrupaciones dendríticas podría derivar del acoplamiento eléctrico que tiene lugar entre dendritas apicales a través de las uniones dendrodendríticas tipo *gap*. Puesto que, en base a nuestros resultados, la fosforilación de la proteína tau podría estar afectando a la morfología neuronal y, por tanto, a su funcionalidad, se podría especular que dicho proceso asociado a la fase de torpor de la hibernación podría estar “apagando” en cierta medida el sistema de agrupaciones dendríticas, dejándolos “congelados” hasta la siguiente fase de despertar. Estos mecanismos en los que el cerebro del animal permanece en un periodo de “pausa” podrían estar involucrados en la mayor tolerancia al daño cerebral descrito durante la hibernación (Zhou *et al.*, 2001).

Finalmente, el hecho de que haya neuronas que solo muestran marcaje AT8 en las zonas distales de sus dendritas apicales principales iría en consonancia con la observación de que el número de troncos o dendritas apicales AT8 positivos que se observan en las capas superficiales es mucho mayor que el número de somas celulares marcados en capas más profundas. Es decir, hay más dendritas apicales marcadas que somas celulares de los que procederían dichas dendritas (Figura 17). Por lo tanto, esta observación, junto con la anterior, apuntarían a que un gran número de neuronas expresan la proteína tau hiperfosforilada detectada mediante el anticuerpo AT8 en las regiones distales, pero no en las proximales ni en el soma.

Este patrón de localización de proteína tau hiperfosforilada recuerda al descrito por Merino-Serráis y colaboradores en 2013, en su estudio llevado a cabo empleando muestras humanas de pacientes con EA en el que describen marcaje PHF-tauAT8 en las regiones más distales de las dendritas analizadas. En dicho estudio sugieren que la pérdida de espinas dendríticas se asocia a la patología de tau intracelular y a la acumulación de estructuras tipo PHF, comenzando dichas alteraciones por las regiones distales primero y luego avanzando hacia las proximales. También describen que la desconexión y la pérdida sináptica ocurriría principalmente en dichas regiones distales, en las que la acumulación de proteína tau hiperfosforilada se hace más evidente (Merino-Serrais *et al.*, 2013). Además, estudios más recientes realizados en muestras de pacientes con EA describen la presencia de elementos AT8-ir en las regiones distales de dendritas basales (Braak and Del Tredici, 2018). Según este estudio, la localización diferencial de tau

hiperfosforilado parece seguir un patrón secuencial, el cual podría apoyar el modelo priónico de la transmisión de la proteína tau y el avance de las taupatías (Braak & Del Tredici, 2018). Nuestros resultados indicarían que esta localización característica de la proteína tau en las regiones distales se daría también en un modelo no patológico como es la hibernación del hámster sirio, lo cual abre un debate acerca del efecto patológico de la hiperfosforilación de tau en neuronas.

6.1.1. Cambios en la morfología neuronal e hiperfosforilación de tau

Árboles dendríticos

Con respecto a la morfología neuronal y sus posibles alteraciones durante la hibernación y más específicamente en aquellas células que presentan proteína tau hiperfosforilada, nuestros resultados indican que, durante la fase de torpor, existen cambios en la morfología neuronal de las células piramidales de la capa V de la corteza somatosensorial del hámster sirio. Brevemente, a nivel de las dendritas apicales, se observa una menor complejidad en las células AT8+, reflejándose esto en una disminución significativa en el número de intersecciones totales al compararse con el grupo control, así como un descenso en el número de nodos y terminaciones al compararse con el grupo control y con el grupo de células AT8-. La morfología neuronal es crucial para su función y, por ello, cambios en dicha morfología podrían estar afectando al procesamiento de información de las células piramidales (e.g., véase Benavides-Piccione et al., 2019). Así, una disminución en la complejidad de la dendrita apical en los 180 μm más próximos al soma en las células PHF-tauAT8 positivas durante la fase de torpor podría implicar una disminución en el número de contactos sinápticos que recibe la neurona. El input que llega a las zonas proximales de la dendrita apical de las neuronas piramidales de la capa V de la corteza proviene, principalmente, de otras capas corticales, lo cual sugiere un papel de integración de la información local que es transmitida a regiones fuera de la corteza, así como dentro de la misma (Narayanan *et al.*, 2015; Ramaswamy and Markram, 2015; Krieger, De Kock and Frick, 2017). Debido a esto, los cambios encontrados podrían suponer un mecanismo de control o reducción del output emitido por la corteza con el fin de regular la actividad del animal durante la fase de torpor y evitar posibles daños asociados.

En cuanto a las dendritas basales, no se encuentran diferencias en cuanto a la complejidad de los árboles, pero sí en cuanto a su morfología, encontrando un aumento en el diámetro y el volumen de estos en las células AT8+ al compararlas con el grupo control y el grupo PHF-tauAT8 negativas. Diversos estudios previos realizados en otras áreas del cerebro de diversas especies de animales que hibernan ya apuntaban a cambios en la morfología neuronal durante la hibernación (Introducción apartado 1.4.1.2 *El cerebro durante la hibernación* Bullmann et al., 2016; Magariños et al., 2006; Popov & Bocharova, 1992; Von Der Ohe et al., 2006, 2007). Sin embargo, hasta el momento, ningún estudio había descrito la relación entre esas alteraciones morfológicas y la presencia o no de proteína tau hiperfosforilada en las células analizadas. Nuestros resultados muestran que, la hiperfosforilación de la proteína tau podría jugar un papel importante en los cambios morfológicos que tienen lugar durante la hibernación del hámster sirio.

Análisis por segmentos

El análisis de las variables morfológicas por segmentos cobra especial importancia a la hora de comprender si las regiones más proximales y las regiones más distales se comportan de la misma manera o si, por el contrario, los cambios se centran en una localización celular concreta.

En este contexto, nuestros datos con respecto a los segmentos del árbol apical indican un aumento en la tortuosidad durante la fase de torpor, predominando estas alteraciones en los segmentos de órdenes mayores. Estas variaciones podrían deberse a un “encogimiento” de las células durante la hibernación, lo cual describen otros autores en estudios anteriores como el de Von der Ohe y colaboradores, en el que muestran una retracción de los árboles dendríticos de células piramidales del área CA3 del hipocampo, células estrelladas de capa IV de la corteza y células del núcleo ventral posterior del tálamo, durante la hibernación de la ardilla terrestre (Von Der Ohe *et al.*, 2006). Además, con respecto a las variables morfológicas, nuestros resultados indican que existe un aumento significativo en la longitud, área y volumen de los segmentos, tanto terminales como intermedios, del grupo que expresa proteína tau hiperfosforilada.

Por otro lado, en cuanto a las dendritas basales, no se observan tantas variaciones en la tortuosidad como en el caso de las dendritas apicales, pero se observa un llamativo aumento en el diámetro de los segmentos de las neuronas con proteína tau hiperfosforilada, así como un aumento en su longitud, área y volumen.

Larkman y colaboradores en su estudio publicado en 1991, describen una similitud morfológica entre el árbol basal y la zona proximal del árbol apical, demostrado que los patrones de ramificación, así como diversas variables de complejidad neuronal son más similares entre las dendritas basales y las dendritas oblicuas que emergen de la dendrita apical que entre estas últimas y la parte distal de la dendrita apical, entre la que se ubicaría la región del penacho (Larkman, 1991). Sin embargo, las diferencias encontradas en la presente tesis apuntan a que, a pesar de las similitudes morfológicas que puedan existir entre ambos árboles dendríticos, su comportamiento durante la hibernación y, específicamente en presencia de proteína tau hiperfosforilada, es distinto. Diversos estudios durante las últimas décadas se han centrado en comprender cómo la morfología neuronal puede afectar a su función: procesamiento neuronal de la información. Así pues, se ha descrito que la longitud dendrítica afecta a la propagación del potencial de acción desde el axón hacia las dendritas y que la alteración de los puntos de ramificación (medidos como nodos en la presente tesis) podría causar fallos en la propagación del impulso nervioso ya que suponen zonas de choque del impulso proveniente de dos ramificaciones distintas (Vetter, Roth and Häusser, 2001; Krieger, De Kock and Frick, 2017). Además, se ha demostrado que diferencias en el diámetro dendrítico afectan a la velocidad de transmisión del impulso nervioso, encontrando mayores velocidades de transmisión con diámetros dendríticos mayores y menores velocidades de transmisión con diámetros menores (Holmes, 1989). Es importante destacar que los diámetros dendríticos mayores se han asociado con una mejor transmisión del input que llega a las regiones distales de la célula, mientras que diámetros menores favorecerían el input proximal (Holmes, 1989). Por otro lado, se ha descrito que las células con árboles dendríticos más grandes (mayor longitud y área) tienen una menor tasa de ráfagas de potenciales de acción, pero muestran espigas mayores. Además, tienen mayores umbrales de activación para pasar del estado quiescente al estado activado (disparando PAs)

(Krichmar *et al.*, 2002). En el estudio realizado por Vetter y colaboradores en 2001, demuestran que la morfología dendrítica afecta a la transmisión del impulso nervioso del axón hacia las dendritas y también de las dendritas al axón, al comparar la transmisión del impulso nervioso en distintos tipos celulares (Vetter, Roth and Häusser, 2001).

Por último, es importante destacar que el aumento observado en el diámetro de las dendritas basales podría estar afectando a la homeostasis del calcio y, con ello a la transmisión del impulso nervioso. Anwar y colaboradores describieron que los niveles de picos de calcio están inversamente relacionados al diámetro dendrítico (Anwar *et al.*, 2014). Esto resulta de gran relevancia ya que la entrada de calcio en el citoplasma de las dendritas y espinas dendríticas está implicada en la remodelación del citoplasma, regulando la morfogénesis dendrítica (Higley and Sabatini, 2008; Rosenberg and Spitzer, 2011). Además, se ha propuesto que la hibernación pudiera promover un descenso en la actividad de los canales de calcio para prevenir la entrada excesiva de este a las células (Gattoni & Bernocchi, 2019; Zhang & Cuevas, 2002).

Por todo lo anterior, proponemos una relación entre la proteína tau hiperfosforilada como un posible mecanismo para prevenir la neurodegeneración mediante la remodelación dendrítica y, en definitiva, la alteración de los equilibrios iónicos (como la homeostasis del calcio) y la transmisión del impulso nervioso en el cerebro del animal que hiberna.

6.1.2. Morfología y distribución de las espinas dendríticas en relación con la hiperfosforilación de la proteína tau

Como se detalla en el apartado de Introducción (apartado 1.3.3.1. *Espinas dendríticas*), la plasticidad y los cambios en las espinas dendríticas, tanto en su densidad y distribución como en su morfología, afectan a la transmisión sináptica. En los estudios realizados en la presente tesis, al igual que se procedió al analizar los árboles dendríticos, se llevó a cabo el análisis de las espinas dendríticas por separado en el árbol basal y en el apical. Comenzando por el árbol apical, puesto que la proteína tau hiperfosforilada solo se localiza en el tronco principal de la dendrita apical, analizamos las espinas dendríticas en dicha región. No se

encuentran variaciones significativas en cuanto a la densidad de espinas dendríticas en la dendrita apical principal en los 180 μm más próximos al soma, mismo resultado que se obtuvo al analizar las dendritas basales.

La densidad de espinas dendríticas tampoco varía significativamente en la región proximal de la dendrita apical de células de capa Va durante la hibernación del hámster sirio. Sin embargo, sí encontramos diferencias significativas en cuanto a su morfología, siendo estas, más largas y gruesas (mayor longitud, área y volumen) en los animales del grupo torpor (con independencia de la presencia de proteína tau hiperfosforilada). Estos resultados han sido inesperados, pues otros estudios llevados a cabo en otras regiones cerebrales como los campos CA1 y CA3 del hipocampo sí describen variaciones en la densidad de espinas dendríticas (Von Der Ohe *et al.*, 2006; Popov *et al.*, 2007). Además, el estudio realizado por Magariños y colaboradores describe alteraciones en la densidad de las espinas dendríticas únicamente en la dendrita apical, mientras que la densidad en las dendritas basales no se vería afectada por la hibernación, así como una disminución en la longitud de las espinas (Magariños *et al.*, 2006). Es importante volver a destacar que los estudios previos realizaron sus mediciones en las zonas más distales de la dendrita apical, pero no en la región proximal.

Las alteraciones en el número de espinas dendríticas podrían ser un indicativo de las diferencias en el número de inputs excitatorios que recibe la célula piramidal, los cambios en el área y volumen de las mismas correlacionarían con el tamaño de la densidad post-sináptica (Majewska, Tashiro and Yuste, 2000).

El análisis preliminar de la densidad de espinas dendríticas en CA3 (Figura 36) refuerza la hipótesis de que los cambios plásticos neuronales durante la hibernación son distintos en corteza e hipocampo. Así, al igual que los resultados descritos por Popov y colaboradores (Popov *et al.*, 1992), encontramos un descenso en el número de espinas en regiones distales de las dendritas colaterales de la apical del área CA3 del hipocampo del hámster sirio en estado torpor.

Por otra parte, otros estudios centrados en el estudio del efecto de la temperatura sobre el cerebro, como el desarrollado por Xie y sus colaboradores empleando la técnica de adquisición de imágenes *in vivo* mediante el microscopio

de dos fotones en neuronas de la capa V de la corteza somatosensorial en ratones revela que, tras varias horas de hipotermia localizada (22°C), el número de espinas dendríticas, así como su estructura, no se ven modificadas en comparación con los ratones del grupo a temperatura normal (Xie, Chen and Murphy, 2012). Estos resultados apuntarían a la existencia de mecanismos específicos que regulan la morfología neuronal durante la hibernación y no a un mero efecto del descenso de la temperatura.

Teniendo lo anterior en cuenta, nuestros resultados podrían indicar que existen respuestas diferentes en función del área del cerebro durante la hibernación además de mecanismos específicos que no pueden ser explicados únicamente por la exposición al frío.

Por último, las variaciones en longitud de las espinas supondrían cambios en el nivel de aislamiento eléctrico y bioquímico con su dendrita parental (Majewska, Tashiro and Yuste, 2000; Merino-Serrais *et al.*, 2013). Sabemos que la longitud de las espinas está relacionada con el aislamiento bioquímico y eléctrico de la misma con respecto al tallo de la dendrita de origen de la espina dendrítica y que el volumen de la cabeza de la espina se relaciona con el área de la densidad postsináptica (Majewska, Tashiro and Yuste, 2000), por lo que los resultados aquí obtenidos podrían tratarse de un mecanismo compensatorio. Puesto que el número de espinas no varía, lo que podría estar ocurriendo es una variación morfológica de forma que las espinas pequeñas y cortas se hagan más largas y grandes, con el fin de preservar información durante la fase de torpor. Futuros estudios sobre la morfología de las espinas durante la fase de *arousal* podrían demostrar esta hipótesis.

Los cambios en la localización de la proteína tau (del axón a las dendritas), podrían ser clave a la hora de comprender las alteraciones a nivel de espinas dendríticas y sinapsis. En condiciones patológicas, como por ejemplo durante la EA, la proteína tau alterada se ha detectado en los terminales pre y post sinápticos, lo cual podría ser uno de los primeros signos de alteración neuronal. Además, otros estudios han hallado proteína tau hiperfosforilada en las excrescencias de las neuronas de CA3 en pacientes con EA (Blazquez-Llorca *et al.*, 2011) y en las espinas de neuronas de CA3 en modelos de ratón transgénico P301S (Hoffmann *et*

al., 2014). En nuestro estudio no hemos detectado, con el anticuerpo AT8, la presencia de tau en espinas dendríticas. Dado que esto podría ser debido a una limitación técnica, futuros experimentos, por ejemplo, aislando vesículas sinápticas podrían aportar información relevante con respecto a la localización de tau en espinas dendríticas y su estado de fosforilación.

6.1.3. Actividad cerebral y morfología neuronal durante la hibernación del hámster sirio

La fase de torpor se caracteriza por un notable descenso generalizado en la actividad neuronal (revisado en Sonntag & Arendt, 2019). Diversos estudios neurofisiológicos basados en electroencefalografía (EEG) realizados a finales del siglo pasado demuestran que tanto la corteza como otras regiones del cerebro se silencian durante la exposición al frío (Krelstein, Thomas and Horowitz, 1990). Esta reducción en la actividad, en paralelo a la bajada de la temperatura, ocurre también a la vez que se detecta una bajada secuencial en la frecuencia de la EEG, primero en la corteza y luego en el hipocampo (Sonntag and Arendt, 2019). Sin embargo, el sistema límbico no se silencia por completo durante la hibernación, puesto que se ha descrito que las neuronas de CA1 son capaces de generar potenciales de acción por debajo de los 15°C, a pesar de no poder generar potenciación a largo plazo (LTP) (Hamilton *et al.*, 2017; Horowitz and Horowitz, 2019).

Según parecen indicar los estudios anteriores, la reducción en la señal de EEG que se da en la hibernación se debería a la bajada de la temperatura (Cerri *et al.*, 2016). Sin embargo, esta asunción genera cierta controversia. Un estudio reciente sostiene que, durante la hibernación de la ardilla terrestre, se mantiene la actividad eléctrica en las neuronas de la corteza somatosensorial (Hoffstaetter *et al.*, 2018). Dicho estudio indica que existen mecanismos compensatorios complejos que involucran un descenso de la actividad de los canales de sodio dependientes de voltaje y que esto no se puede explicar o simular simplemente mediante un descenso de la temperatura, sino que es un proceso exclusivo de la hibernación. Sin embargo, desconocemos la posible relación entre las alteraciones encontradas en la presente tesis y las alteraciones de la actividad neuronal a nivel global, ya que esta actividad depende también de muchos otros factores que no han sido

analizados en el presente estudio. Por ejemplo, estudios mediante la técnica de hibridación *in situ* describieron que, durante la hibernación de la ardilla terrestre, la expresión de c-Fos se suprime en la corteza (Bratincsák *et al.*, 2007). Además, en el mismo modelo, otro grupo de investigación demostró que la incorporación de C-2-desoxiglucosa se ve reducida durante la hibernación (Kilduff *et al.*, 1990). Ambos estudios recalcan que, durante el estado torpor, se inhibe la actividad cortical, lo cual mantiene la línea de los estudios citados anteriormente. Sin embargo, estos dos estudios también demuestran una activación de ciertas regiones hipotalámicas, como el núcleo supraquiasmático, que podrían ser las responsables de la entrada a la fase de *arousal*. Así, los resultados obtenidos en la presente tesis han ayudado a abrir una nueva línea de investigación que se está desarrollando en el Instituto Cajal y que se centra en la determinación, mediante un estudio electrofisiológico, de los cambios en la actividad neuronal asociados a la hibernación.

Otro elemento que podría darnos pistas sobre la actividad celular durante la hibernación es el estudio de otros tipos celulares, como la microglía o los cambios en orgánulos, como el aparato de Golgi (GA por sus siglas en inglés *Golgi Apparatus*), un orgánulo implicado en el procesamiento y transporte de proteínas entre otras funciones y que sufre una serie de modificaciones durante la fase de torpor de la hibernación en el hámster sirio que se revierten en la fase de *arousal*. Se ha demostrado que, durante la fase de torpor, el GA sufre una reducción general de su volumen y su superficie tanto en el hipocampo como en la corteza cerebral del hámster sirio (Antón-Fernández *et al.*, 2015).

6.1.4. *Modificaciones de la microglía durante la hibernación del hámster sirio*

Con respecto a las células de microglía, en la presente tesis se ha demostrado que sufren cambios en su morfología durante la fase de torpor de la hibernación en el hámster sirio, presentando estrechamientos, irregularidades y protuberancias en sus prolongaciones. Además, estos cambios ocurren de manera homogénea en las áreas estudiadas (corteza e hipocampo) indicando un efecto generalizado durante la hibernación.

Durante el desarrollo de la EA se han descrito numerosas alteraciones en las células de microglía, algunas de ellas relacionadas con los depósitos de A β ya que las placas seniles suelen encontrarse rodeadas de microglía alterada (McGeer *et al.*, 1993; Bolmont *et al.*, 2008; Gyoneva *et al.*, 2019). Sin embargo, otros estudios encuentran alteraciones en la microglía asociadas a los depósitos de proteína tau hiperfosforilada (Streit *et al.*, 2014). También se ha descrito que las neuronas en degeneración que contienen depósitos de proteína tau hiperfosforilada colocan con células de microglía distróficas (Streit, Mrak and Griffin, 2004; Streit and Xue, 2009; Sanchez-Mejias *et al.*, 2016). Además de encontrarse en pacientes con EA, las células de microglía distróficas se han descrito en diversas neuropatologías, como la Enfermedad de Huntington o en la Esclerosis lateral amiotrófica (Simmons *et al.*, 2007). Se considera que estas células se encuentran en fase de senescencia a causa de la edad y la patología y que ya no son funcionales. Estas células de microglía distróficas se pueden describir en base a su morfología, caracterizada por su forma esferoide, así como por la pérdida de ramificaciones y la aparición de estrechamientos y ensanchamientos a lo largo de estas (Streit, Mrak and Griffin, 2004; Streit *et al.*, 2014). Las alteraciones morfológicas descritas en la presente tesis en el cerebro del hámster sirio en hibernación recuerdan o se asemejan a las descritas en cerebros de pacientes con EA. Sin embargo, a pesar de las similitudes, existen importantes diferencias: (1) los animales en hibernación no poseen células de microglía activadas que se asemejen a las que se encuentran rodeando las placas seniles en la EA (McGeer *et al.*, 1993; Gyoneva *et al.*, 2019); (2) las células de microglía alteradas en los animales durante la fase de torpor no contienen formaciones esféricas, las cuales sí se encuentran en algunas células de microglía distróficas en pacientes con EA (Streit, Mrak and Griffin, 2004; Streit and Xue, 2009; Sanchez-Mejias *et al.*, 2016); (3) mientras que la distrofia de las células de microglía en la EA se considera un fenómeno progresivo y probablemente no reversible (Sanchez-Mejias *et al.*, 2016), los cambios encontrados en animales durante la fase de torpor son adaptativos y se revierten de manera rápida cuando el animal abandona esta fase de la hibernación.

A pesar de la inactividad neuronal descrita en diversas áreas del cerebro durante la hibernación, los animales son capaces de percibir estímulos externos como los cambios de temperatura, estímulos táctiles y acústicos (Strumwasser,

1958). Esto indica que el sistema sensorial no puede estar completamente silenciado, sino que deben mantenerse ciertas conexiones funcionales con otras áreas cerebrales. Los estudios a nivel molecular y electrofisiológico anteriormente citados parecen apuntar a que, durante la hibernación, se da una regulación de la actividad cerebral dependiente del área y que esta podría estar relacionada con las diferencias en cuanto a las variaciones morfológicas que se observan a nivel neuronal. Estudios futuros *in vivo* resultan necesarios para poder confirmar y esclarecer el patrón de conectividad cerebral que tiene lugar durante la hibernación.

6.2. *Hiperfosforilación de la proteína tau como posible mecanismo neuroprotector*

Durante la fase de torpor, se ha descrito un aumento en los sistemas de defensa antioxidantes del organismo, así como un descenso en la respuesta de las células de microglía, indicando una mayor tolerancia ante el daño celular en comparación con animales que no hibernan (Buzadzić *et al.*, 1990; Zhou *et al.*, 2001). Esto parece indicar que la hibernación promueve mecanismos de protección, que son especialmente importantes en el cerebro. Nuestros resultados apuntan que, durante la hibernación, la proteína tau hiperfosforilada juega un papel tanto en la remodelación dendrítica como en el control de la transmisión nerviosa y esto podría estar ligado a dichos mecanismos neuroprotectores.

Algunos experimentos realizados *in vitro* demuestran que la fosforilación de la serina 212 podría inhibir la agregación de tau (Schneider *et al.*, 1999). Además, se ha descrito que la fosforilación de la proteína tau en la treonina 205 podría tener un papel protector o preventivo de la toxicidad generada por la acumulación de A β (Ittner *et al.*, 2016) y que la fosforilación en la serina 305 podría inhibir la agregación de la proteína tau (Strang *et al.*, 2019). En relación con lo anterior, se ha demostrado en un estudio en pacientes con EA, que la fosforilación de tau en las posiciones 202/205 no es suficiente para promover alteraciones morfológicas en las neuronas (a nivel de espinas dendríticas) (Merino-Serrais *et al.*, 2013). Resulta llamativo el hecho de que la hiperfosforilación de tau en el extremo N- terminal o extremo rico en prolinas, se asocia con la ausencia de PHFs y prevalece durante los estadios iniciales de la patología de tau, mientras que la fosforilación en el extremo C- terminal se asocia con la formación de PHFs y domina durante los estadios

tardíos de la patología. Así pues, proponemos que, durante el desarrollo de la citopatología en la EA, la fosforilación de la proteína tau parece avanzar de forma secuencial desde el extremo N- terminal hacia el extremo C- terminal (Figura 44). Por lo tanto, se podría plantear la existencia de un balance entre el papel protector de tau y su acumulación tóxica, dependiendo de los residuos en los que tenga lugar la hiperfosforilación de la proteína. Esto es aún un tema de debate entre diversos autores (Castellani *et al.*, 2008; Avila *et al.*, 2012; Cowan and Mudher, 2013; Hurtley, 2018).

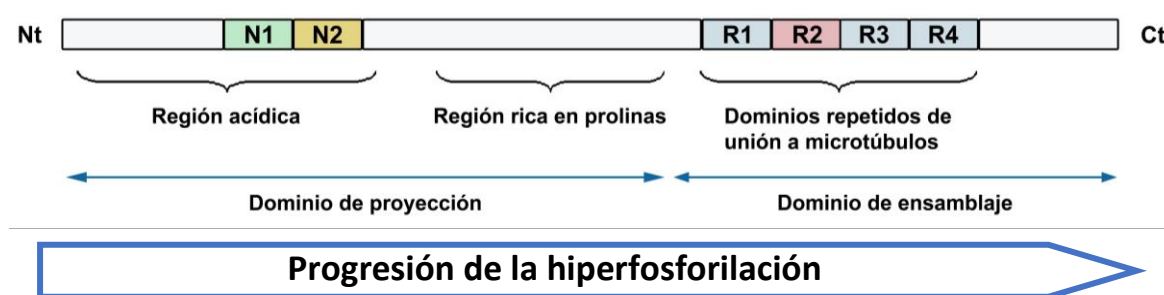


Figura 43| Ilustración esquemática en la que se muestra la progresión de la hiperfosforilación de la proteína tau desde el extremo N-terminal de la proteína hacia el extremo C-terminal.

Para entender los mecanismos que tienen lugar durante la hibernación y que tienen como finalidad proteger al animal de las bajas temperaturas o a la hipoxia asociadas, se han realizado, entre otros, estudios genómicos, proteómicos y metabolómicos, como el incluido en la presente tesis en colaboración con la Dra. Coral Barbas y su equipo del CEMBio (Gonzalez-Riano *et al.*, 2019). En relación con ello, estudios anteriores han descrito que la fosforilación de la proteína tau durante la hibernación podría deberse a un descenso del metabolismo. Así, en un estudio realizado en ratones se demostró que la fosforilación de tau de manera reversible ocurría en condiciones de niveles bajos de glucosa (Yanagisawa *et al.*, 1999). Además, se ha descrito que la hipotermia podría inducir la hiperfosforilación de la proteína tau por medio de la inhibición de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) (Planel *et al.*, 2007). En línea con lo anterior, otros estudios han demostrado una reducción en la tasa metabólica de la glucosa en cerebros de pacientes con EA (Jagust *et al.*, 1991; Mielke and Heiss, 1998; Hoffmann *et al.*, 2000), lo cual podría contribuir al declive cognitivo mucho antes de la aparición de

los síntomas clínicos (de Leon *et al.*, 2001). Podría especularse que dicha situación metabólica prolongada en el tiempo podría inducir una hiperfosforilación de la proteína tau permanente que derivaría en estructuras fibrilares y, finalmente, causaría deterioro neuronal.

Nuestros resultados confirman que los cambios en ciertos metabolitos, como algunos aminoácidos, así como en diversas rutas metabólicas resultan cruciales durante la hibernación. Por ello, consideramos de vital importancia el estudio en profundidad de los mecanismos que subyacen a la reversibilidad de la hiperfosforilación de la proteína tau, así como los que están involucrados en sus cambios de expresión en los distintos compartimentos celulares y el estudio de las diferencias en los patrones espacio temporales de hiperfosforilación de tau.

6.3. Fosforilación de tau y la formación de ovillos neurofibrilares en la EA

Nuestros resultados con respecto a la fosforilación de tau en pacientes con EA indican que: (1) la ratio AT100/pS396 disminuye en línea con la patología de tau en las muestras analizadas y (2) la mayoría de las neuronas del área CA1 del hipocampo humano de aquellos casos con estadio de Braak IV-VI no mostraron colocalización entre los marcajes de AT100 y pS396 (27% de colocalización). También se ha demostrado que, en los casos con estadio de Braak más avanzado, el marcaje con pS396 es predominante en la región del hipocampo analizado.

Estos datos demuestran que el uso de un único anticuerpo para visualizar o cuantificar proteína tau fosforilada podría estar representado una muestra reducida de la población total de neuronas fosfo-tau positivas, por lo que se debe ser consciente de ello a la hora de sacar conclusiones como resultado de los experimentos.

Algunos de los casos utilizados en nuestro estudio se caracterizan por tener un estadio de Braak bajo y ausencia de placas de beta amiloide. Dado que se ha descrito que la patología típica de la EA aparece en el 80% de las personas mayores de 65 años, pero no se manifiesta clínicamente en forma de demencia más que en un porcentaje reducido de los mismos, es posible que dichos casos (como, por ejemplo, IF8, AB5 y AB6), representen un estadio previo a la demencia (Ferrer, 2012).

Un reciente estudio recientemente caracteriza, mediante la técnica de *western Blot*, los patrones temporales y espaciales de la hiperfosforilación de la proteína tau durante el desarrollo de la EA (Neddens et al., 2018). Sin embargo, en este tipo de estudios, la técnica de *western Blot* provee valores medios en los que se encuentran mezclados los ovillos neurofibrilares intracelulares (iNFT) y los ovillos neurofibrilares extracelulares (eNFT), haciendo que la interpretación de los resultados resulte confusa.

Como se detalla en la introducción, la proteína tau tiene, de forma nativa, una conformación no plegada, que imita la forma de un “clip”. Estudios previos han demostrado que, cuando la proteína tau se encuentra fosforilada en los residuos S396 y S404, la conformación que adopta es más abierta (Jeganathan *et al.*, 2006). Además, con respecto a la evolución de los NFTs durante la patología de tau, sabemos que lo hacen de manera secuencial en función del epítipo fosforilado y, por tanto, de la conformación adoptada por la proteína tau. Un estudio de García-Sierra y colaboradores demuestra que la conformación de la proteína tau detectada por el anticuerpo Alz50, que mantiene los extremos N- y C- terminal intactos, precede a la conformación detectada por el anticuerpo tau66, que se caracteriza por un truncamiento en ambos extremos (Garcia-Sierra *et al.*, 2003). Por lo tanto, el orden por el cual tau se fosforila podría afectar a su conformación tridimensional. Si este es el caso, los resultados expuestos en la presente tesis sugieren que la transición de los epítipos T212/S214 fosforilados al epítipo S396 fosforilado promueve una alteración conformacional en la proteína tau de forma que la detección mediante el anticuerpo AT100 se vería impedida. Para comprobar si dicho cambio conformacional contribuye también a la formación de ovillos neurofibrilares tóxicos para la célula se requieren estudios posteriores. Sin embargo, existen otras posibilidades para explicar los resultados obtenidos en el presente estudio. Por un lado, sabemos que la S396 se fosforila gracias a la quinasa GSK3 (vía receptores de insulina) mientras que los sitios reconocidos por AT100 se fosforilan por otras quinasas como Dyrk1, PKA, JNK o PKB/AKT (vía receptores NMDA y calcio) (Gärtner *et al.*, 1998; Yoshida and Goedert, 2006; Hanger, Anderton and Noble, 2009). Por lo tanto, podríamos hipotetizar que hay una actividad de quinasas específicas para cada neurona de forma que el patrón de hiperfosforilación de tau sea distinto en ellas y, por ello, también sea distinto el

avance de la patología. Por último, existe la posibilidad de que, tras la generación de subproductos tóxicos de la proteína tau (Garcia-Sierra *et al.*, 2003), los agregados del extremo C- terminal no sean accesibles para las proteasas encargadas de degradarlos, pero que esto sí ocurra en la región rica en prolinas, favoreciendo las posteriores fosforilaciones en el extremo C-terminal.

Otro de los aspectos que debe tenerse en consideración es el tiempo postmortem de los cerebros utilizados ya que diversos estudios corroboran que podría afectar a la degradación/preservación de tau y otras proteínas hiperfosforiladas (Gärtner *et al.*, 1998; Gonzalez-Riano *et al.*, 2017). Generalmente, el tiempo postmortem en los estudios realizados con cerebros humanos varía desde 2 horas a varios días, lo cual debería tenerse muy en consideración a la hora de establecer relaciones u obtener conclusiones relacionadas con la hipersofrorilación de tau u otras proteínas y el avance de la EA. Los cerebros utilizados en el presente estudio cuentan con tiempos postmortem bajos (menos de 6 horas), lo cual minimiza el posible efecto de degradación de la proteína tau (*vid.*Tabla 1).

En resumen, el presente trabajo representa un avance en el entendimiento de los mecanismos de fosforilación de la proteína tau, así como de la formación de ovillos neurofibrilares y la progresión de la EA.

7. Conclusiones

Las conclusiones obtenidas tras el desarrollo de la presente tesis doctoral son las siguientes:

1. La hiperfosforilación de la proteína tau en la hibernación del hámster sirio tiene efectos específicos sobre la morfología dendrítica, observándose un aumento en la complejidad dendrítica y tortuosidad del árbol apical y un aumento del diámetro y volumen de las dendritas basales de las neuronas piramidales de la capa Va de la corteza cerebral del hámster sirio.
2. La hiperfosforilación de la proteína tau en la hibernación del hámster sirio no parece tener efectos específicos sobre la densidad y distribución de las espinas de las dendritas basales y la región proximal de la dendrita apical principal de las neuronas piramidales de la capa Va de la corteza cerebral del hámster sirio.
3. La hibernación afecta a la morfología de las espinas dendríticas de forma independiente a la hiperfosforilación de la proteína tau. Nuestros resultados indican que existe un aumento en la longitud, área y volumen de las espinas de dendritas basales y de la región proximal de la dendrita apical principal en neuronas piramidales de la capa Va de la corteza cerebral del hámster sirio.
4. Las células de microglía sufren cambios en su morfología y en los patrones de marcaje mediante el anticuerpo iba-1 durante la fase de torpor en diversas áreas del cerebro del hámster sirio en hibernación. Estas alteraciones son reversibles cuando los animales entran en la fase de *arousal* o salen de la hibernación.
5. Durante la hibernación del hámster sirio tiene lugar un aumento de los niveles de ceramidas con más de 20 átomos de carbono parece indicar una mayor actividad de CerS2, enzima implicada en la formación de ovillos neurofibrilares y cambios estructurales en el aparato de Golgi.
6. En la enfermedad de Alzheimer, el cociente entre el número de neuronas detectadas mediante el anticuerpo AT100 y el número de neuronas marcadas con el anticuerpo pS396 (ratio AT100/pS396) disminuye de manera proporcional al aumento del Estadio de Braak.

7. En la enfermedad de Alzheimer, la mayor parte de las neuronas del área CA1 del hipocampo humano de aquellos casos con estadio de Braak avanzado (IV-VI) no mostraron colocación entre los marcajes de AT100 y pS396 (27% de colocación).
8. En los casos de pacientes con Enfermedad de Alzheimer con estadio de Braak más avanzado (IV-VI), el marcaje con pS396 es predominante frente a otros marcadores como AT100 o AT8 en la región CA1 del hipocampo.

8. Bibliografía

- Alzheimer, A. (1907) 'Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde.', *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin*, 64, pp. 146–148.
- Andreadis, A. (2006) 'Misregulation of Tau Alternative Splicing in Neurodegeneration and Dementia.', *Progress in Molecular and Subcellular Biology*.
- Antón-Fernández, A. *et al.* (2015) 'Changes in the Golgi apparatus of neocortical and hippocampal neurons in the hibernating hamster', *Frontiers in Neuroanatomy*, 9(DEC), pp. 1–15. doi: 10.3389/fnana.2015.00157.
- Anwar, H. *et al.* (2014) 'Dendritic diameters affect the spatial variability of intracellular calcium dynamics in computer models ', *Frontiers in Cellular Neuroscience* , p. 168. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2014.00168>.
- Arendt, T. *et al.* (2003) 'Reversible paired helical filament-like phosphorylation of tau is an adaptive process associated with neuronal plasticity in hibernating animals', *Journal of Neuroscience*, 23(18), pp. 6972–6981. doi: 10.1523/jneurosci.23-18-06972.2003.
- Attardo, A., Fitzgerald, J. E. and Schnitzer, M. J. (2015) 'Impermanence of dendritic spines in live adult CA1 hippocampus', *Nature*. 2015/06/22, 523(7562), pp. 592–596. doi: 10.1038/nature14467.
- Augustinack, J. C. *et al.* (2002) 'Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease', *Acta Neuropathologica*, 103(1), pp. 26–35. doi: 10.1007/s004010100423.
- Avila, J. *et al.* (2004) 'Role of Tau Protein in Both Physiological and Pathological Conditions', *Physiological Reviews*, 84(2), pp. 361–384. doi: 10.1152/physrev.00024.2003.
- Avila, J. *et al.* (2012) 'Tau phosphorylation by GSK3 in different conditions', *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2012. doi: 10.1155/2012/578373.
- Avila, J. *et al.* (2016) 'Tau Structures', *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8(NOV), pp. 1–10. doi: 10.3389/fnagi.2016.00262.
- Bachiller, S. *et al.* (2018) 'Microglia in neurological diseases: A road map to brain-disease dependent-inflammatory response', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12(December), pp. 1–17. doi: 10.3389/fncel.2018.00488.
- Ballesteros-Yáñez, I. *et al.* (2010) 'Alterations of cortical pyramidal neurons in mice lacking high-affinity nicotinic receptors', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(25), pp. 11567 LP – 11572. doi: 10.1073/pnas.1006269107.
- Bannister, N. J. and Larkman, A. U. (1995) 'Dendritic morphology of CA1 pyramidal neurones from the rat hippocampus: I. Branching patterns', *Journal of Comparative Neurology*, 360(1), pp. 150–160. doi: 10.1002/cne.903600111.
- Bekris, L. M. *et al.* (2010) 'Genetics of Alzheimer disease', *Journal of geriatric psychiatry and neurology*, 23(4), pp. 213–227. doi: 10.1177/0891988710383571.
- Benavides-Piccione, R. *et al.* (2002) 'Cortical area and species differences in dendritic spine morphology', *Journal of Neurocytology*, 31(3-5 SPEC. ISS.), pp. 337–346. doi: 10.1023/A:1024134312173.
- Benavides-Piccione, R. *et al.* (2006) 'Dendritic size of pyramidal neurons differs among

mouse cortical regions', *Cerebral Cortex*, 16(7), pp. 990–1001. doi: 10.1093/cercor/bhj041.

Benavides-Piccione, R. *et al.* (2019) 'Differential Structure of Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons in the Human and Mouse', *Cerebral Cortex*, (July), pp. 1–23. doi: 10.1093/cercor/bhz122.

Bianchi, S. *et al.* (2013) 'Dendritic morphology of pyramidal neurons in the chimpanzee neocortex: Regional specializations and comparison to humans', *Cerebral Cortex*, 23(10), pp. 2429–2436. doi: 10.1093/cercor/bhs239.

Blazquez-Llorca, L. *et al.* (2011) 'Abnormal tau phosphorylation in the thorny excrescences of CA3 hippocampal neurons in patients with Alzheimer's disease', *Journal of Alzheimer's Disease*, 26(4), pp. 683–698. doi: 10.3233/JAD-2011-110659.

Bolmont, T. *et al.* (2008) 'Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(16), pp. 4283–4292. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4814-07.2008.

Bosch, M. and Hayashi, Y. (2012) 'Structural plasticity of dendritic spines', *Current opinion in neurobiology*. 2011/09/28, 22(3), pp. 383–388. doi: 10.1016/j.conb.2011.09.002.

Bourne, J. and Harris, K. M. (2007) 'Do thin spines learn to be mushroom spines that remember?', *Current Opinion in Neurobiology*, 17(3), pp. 381–386. doi: 10.1016/j.conb.2007.04.009.

Braak, F., Braak, H. and Mandelkow, E. M. (1994) 'A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads', *Acta Neuropathologica*, 87(6), pp. 554–567. doi: 10.1007/BF00293315.

Braak, H. *et al.* (1986) 'Occurrence of neuropil threads in the senile human brain and in Alzheimer's disease: A third location of paired helical filaments outside of neurofibrillary tangles and neuritic plaques', *Neuroscience Letters*, 65(3), pp. 351–355. doi: [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(86\)90288-0](https://doi.org/10.1016/0304-3940(86)90288-0).

Braak, H., Alafuzoff, I., Arzberger, T., Kretschmar, H. and Del Tredici, K. (2006) 'Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry', *Acta neuropathologica*, 112(4), pp. 389–404. doi: 10.1007/s00401-006-0127-z.

Braak, H., Alafuzoff, I., Arzberger, T., Kretschmar, H. and Tredici, K. (2006) 'Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry', *Acta Neuropathologica*, 112(4), pp. 389–404. doi: 10.1007/s00401-006-0127-z.

Braak, H. and Braak, E. (1991) 'Neuropathological staging of Alzheimer-related changes', *Acta Neuropathologica*, 82(4), pp. 239–259. doi: 10.1007/BF00308809.

Braak, H. and Del Tredici, K. (2015) 'The preclinical phase of the pathological process underlying sporadic Alzheimer's disease.', *Brain : a journal of neurology*, 138(Pt 10), pp. 2814–2833. doi: 10.1093/brain/awv236.

Braak, H. and Del Tredici, K. (2018) 'Spreading of Tau Pathology in Sporadic Alzheimer's Disease Along Cortico-cortical Top-Down Connections', *Cerebral Cortex*, 28(9), pp. 3372–3384. doi: 10.1093/cercor/bhy152.

Bratincsák, A. *et al.* (2007) 'Spatial and Temporal Activation of Brain Regions in

Hibernation: c-fos Expression during the Hibernation Bout in Thirteen-Lined Ground Squirrel', *The Journal of comparative neurology*, 505, pp. 443–458. doi: 10.1002/cne.21507.

Brunnström, H. and Englund, E. (2011) 'Comparison of four neuropathological scales for Alzheimer's disease', *Clinical Neuropathology*, 30(2), pp. 56–69. doi: 10.5414/NPP30056.

Bullmann, T. *et al.* (2016) 'Tau phosphorylation-associated spine regression does not impair hippocampal-dependent memory in hibernating golden hamsters', *Hippocampus*, 26(3), pp. 301–318. doi: 10.1002/hipo.22522.

Buzadzić, B. *et al.* (1990) 'Antioxidant defenses in the ground squirrel *Citellus citellus*. 2. The effect of hibernation.', *Free radical biology & medicine*, 9(5), pp. 407–413. doi: 10.1016/0891-5849(90)90017-d.

Buzsaki, G. *et al.* (1988) 'Nucleus basalis and thalamic control of neocortical activity in the freely moving rat', *Journal of Neuroscience*, 8(11), pp. 4007–4026. doi: 10.1523/jneurosci.08-11-04007.1988.

Cajal, S. R. (1899) 'Histología del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados', *Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid*.

Cajal, S. R. y (1909) *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*.

Castellani, R. J. *et al.* (2008) 'Phosphorylated tau: toxic, protective, or none of the above', *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 14(4), pp. 377–383. doi: 10.3233/jad-2008-14404.

Cerri, M. *et al.* (2016) 'Hibernation for space travel: Impact on radioprotection', *Life Sciences in Space Research*, 11(September), pp. 1–9. doi: 10.1016/j.lssr.2016.09.001.

Cogut, V. *et al.* (2017) 'Brain Inflammatory Cytokines And Microglia Morphology Changes Throughout Hibernation Phases In Syrian Hamster', *Brain, Behavior, and Immunity*, 68. doi: 10.1016/j.bbi.2017.10.009.

Connors, B. W. (1994) 'Intrinsic neuronal physiology and the functions, dysfunctions and development of neocortex', in Van Pelt, J. *et al.* (eds) *The Self-Organizing Brain: From Growth Cones to Functional Networks*. Elsevier, pp. 195–203. doi: [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)60540-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)60540-3).

Connors, B. W. (2003) 'Cauller & Connors 94', *The Journal of Neuroscience*, 14(February), pp. 1–12. Available at: [papers2://publication/uuid/405CF7BA-5F4E-439A-91D9-40EBFF5176D8](https://pubs2://publication/uuid/405CF7BA-5F4E-439A-91D9-40EBFF5176D8).

Cowan, C. M. and Mudher, A. (2013) 'Are tau aggregates toxic or protective in tauopathies?', *Frontiers in neurology*, 4, p. 114. doi: 10.3389/fneur.2013.00114.

Crick, F. (1982) 'Do dendritic spines twitch?', *Trends in Neurosciences*, 5, pp. 44–46. doi: [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(82\)90020-0](https://doi.org/10.1016/0166-2236(82)90020-0).

Dave, K. R. *et al.* (2012) 'Neuroprotection: Lessons from hibernators', *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 162(1–3), pp. 1–9. doi: 10.1016/j.cbpb.2012.01.008.

DeFelipe, J. (2005a) 'Cajal y sus dibujos: ciencia y arte'. Saned. Available at: <http://hdl.handle.net/10261/12879>.

DeFelipe, J. (2005b) 'Reflections on the structure of the cortical minicolumn', *Neocortical*

modularity and the cell minicolumn, pp. 57–92.

DeFelipe, J. (2011) 'The Evolution of the Brain, the Human Nature of Cortical Circuits, and Intellectual Creativity', *Frontiers in Neuroanatomy*, 5, p. 29. doi: 10.3389/fnana.2011.00029.

DeFelipe, J. (2015) 'The anatomical problem posed by brain complexity and size: a potential solution', *Frontiers in Neuroanatomy*, 9, p. 104. doi: 10.3389/fnana.2015.00104.

DeFelipe, J. and Fariñas, I. (1992) 'The pyramidal neuron of the cerebral cortex: Morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs', *Progress in Neurobiology*, 39(6), pp. 563–607. doi: 10.1016/0301-0082(92)90015-7.

Deitcher, Y. *et al.* (2017) 'Comprehensive Morpho-Electrotonic Analysis Shows 2 Distinct Classes of L2 and L3 Pyramidal Neurons in Human Temporal Cortex', *Cerebral Cortex*, 27(11), pp. 5398–5414. doi: 10.1093/cercor/bhx226.

Desmond, N. L. and Levy, W. B. (1986) 'Changes in the postsynaptic density with long-term potentiation in the dentate gyrus', *Journal of Comparative Neurology*, 253(4), pp. 476–482. doi: 10.1002/cne.902530405.

Détári, L. (2000) 'Tonic and phasic influence of basal forebrain unit activity on the cortical EEG', *Behavioural Brain Research*, 115(2), pp. 159–170. doi: [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(00\)00256-4](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(00)00256-4).

Deture, M. A. and Dickson, D. W. (2019) 'The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease', *Molecular Neurodegeneration*, 14(1), pp. 1–18. doi: 10.1186/s13024-019-0333-5.

Duvernoy, H. M. (2005) *Book: The Human Hippocampus: Functional Anatomy, Vascularization and Serial Sections with MRI, Rivista di Neuroradiologia*. doi: 10.1177/19714009050180s220.

Elston, G. N., Benavides-Piccione, R. and DeFelipe, J. (2001) 'The pyramidal cell in cognition: a comparative study in human and monkey.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(17). doi: 10.1523/jneurosci.21-17-j0002.2001.

Fasulo, L. *et al.* (2000) 'The neuronal microtubule-associated protein tau is a substrate for caspase-3 and an effector of apoptosis', *Journal of Neurochemistry*, 75(2), pp. 624–633. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.0750624.x.

Ferrer, I. (2012) 'Defining Alzheimer as a common age-related neurodegenerative process not inevitably leading to dementia.', *Progress in neurobiology*, 97(1), pp. 38–51. doi: 10.1016/j.pneurobio.2012.03.005.

Fiala, J. C., Spacek, J. and Harris, K. M. (2002) 'Dendritic spine pathology: Cause or consequence of neurological disorders?', *Brain Research Reviews*, 39(1), pp. 29–54. doi: 10.1016/S0165-0173(02)00158-3.

Fifková, E. and Van Harreveld, A. (1977) 'Long-lasting morphological changes in dendritic spines of dentate granular cells following stimulation of the entorhinal area', *Journal of Neurocytology*, 6(2), pp. 211–230. doi: 10.1007/BF01261506.

Frame, S., Cohen, P. and Biondi, R. M. (2001) 'A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation.', *Molecular cell*, 7(6), pp. 1321–1327. doi: 10.1016/s1097-2765(01)00253-2.

- Friedhoff, P. *et al.* (2000) 'Structure of tau protein and assembly into paired helical filaments', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1502(1), pp. 122–132. doi: 10.1016/S0925-4439(00)00038-7.
- Furcila, D., Defelipe, J. and Alonso-Nanclares, L. (2018) 'A Study of Amyloid- β and Phosphotau in Plaques and Neurons in the Hippocampus of Alzheimer's Disease Patients', *Journal of Alzheimer's Disease*, 64(2), pp. 417–435. doi: 10.3233/JAD-180173.
- Garcia-Sierra, F. *et al.* (2003) 'Conformational changes and truncation of tau protein during tangle evolution in Alzheimer's disease.', *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 5(2), pp. 65–77. doi: 10.3233/jad-2003-5201.
- Gärtner, U. *et al.* (1998) 'Postmortem changes in the phosphorylation state of tau-protein in the rat brain.', *Neurobiology of aging*, 19(6), pp. 535–543. doi: 10.1016/s0197-4580(98)00094-3.
- Gattoni, G. and Bernocchi, G. (2019) 'Calcium-Binding Proteins in the Nervous System during Hibernation: Neuroprotective Strategies in Hypometabolic Conditions?', *International journal of molecular sciences*, 20(9). doi: 10.3390/ijms20092364.
- Geiser, F. (2004) 'Metabolic Rate and Body Temperature Reduction During Hibernation and Daily Torpor', *Annual Review of Physiology*, 66(1), pp. 239–274. doi: 10.1146/annurev.physiol.66.032102.115105.
- Geiser, F. (2013) 'Hibernation', *Current Biology*, 23(5), pp. 188–193. doi: 10.1016/j.cub.2013.01.062.
- Goard, M. and Dan, Y. (2009) 'Basal forebrain activation enhances cortical coding of natural scenes', *Nature Neuroscience*, 12(11), pp. 1444–1449. doi: 10.1038/nn.2402.
- Goedert, M. *et al.* (1996) 'Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans', *Nature*, 383(6600), pp. 550–553. doi: 10.1038/383550a0.
- Goedert, M. (1997) 'The Neurofibrillary Pathology of Alzheimer's Disease', *The Neuroscientist*, 3(2), pp. 131–141. doi: 10.1177/107385849700300212.
- Goedert, M. and Jakes, R. (1990) 'Expression of separate isoforms of human tau protein: Correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization', *EMBO Journal*, 9(13), pp. 4225–4230. doi: 10.1002/j.1460-2075.1990.tb07870.x.
- Gong, C. X. *et al.* (2000) 'Phosphorylation of microtubule-associated protein tau is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain. Implications for neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease.', *The Journal of biological chemistry*, 275(8), pp. 5535–5544. doi: 10.1074/jbc.275.8.5535.
- Gonzalez-Riano, C. *et al.* (2017) 'Metabolomics and neuroanatomical evaluation of post-mortem changes in the hippocampus', *Brain Structure and Function*, 222(6), pp. 2831–2853. doi: 10.1007/s00429-017-1375-5.
- Gonzalez-Riano, C. *et al.* (2019) 'Metabolomic Study of Hibernating Syrian Hamster Brains: In Search of Neuroprotective Agents', *Journal of Proteome Research*, 18(3), pp. 1175–1190. doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00816.
- Greenough, W. T., Larson, J. R. and Withers, G. S. (1985) 'Effects of unilateral and bilateral training in a reaching task on dendritic branching of neurons in the rat motor-sensory forelimb cortex', *Behavioral and Neural Biology*, 44(2), pp. 301–314. doi:

[https://doi.org/10.1016/S0163-1047\(85\)90310-3](https://doi.org/10.1016/S0163-1047(85)90310-3).

Gu, Y., Oyama, F. and Ihara, Y. (1996) 'τ Is Widely Expressed in Rat Tissues', *Journal of Neurochemistry*, 67(3), pp. 1235–1244. doi: 10.1046/j.1471-4159.1996.67031235.x.

Gyoneva, S. *et al.* (2019) 'Cx3cr1-deficient microglia exhibit a premature aging transcriptome', *Life science alliance*, 2(6), p. e201900453. doi: 10.26508/lsa.201900453.

Hamilton, N. B. *et al.* (2017) 'Endogenous GABA controls oligodendrocyte lineage cell number, myelination, and CNS internode length', *Glia*. 2016/10/31, 65(2), pp. 309–321. doi: 10.1002/glia.23093.

Hanger, D. P., Anderton, B. H. and Noble, W. (2009) 'Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease', *Trends in Molecular Medicine*, 15(3), pp. 112–119. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.01.003>.

Harris, K. D. and Shepherd, G. M. G. (2015) 'The neocortical circuit: themes and variations', *Nature neuroscience*. 2015/01/27, 18(2), pp. 170–181. doi: 10.1038/nn.3917.

Harris, K. and Spacek, J. (2016) 'Dendrite structure', in, pp. 1–46. doi: 10.1093/acprof:oso/9780198745273.003.0001.

Heck, N. and Benavides-Piccione, R. (2015) 'Editorial: Dendritic spines: From shape to function', *Frontiers in neuroanatomy*, 9, p. 101. doi: 10.3389/fnana.2015.00101.

Hering, H. and Sheng, M. (2001) 'Dendritic spines: structure, dynamics and regulation', *Nature Reviews Neuroscience*, 2(12), pp. 880–888. doi: 10.1038/35104061.

Higley, M. J. and Sabatini, B. L. (2008) 'Calcium signaling in dendrites and spines: practical and functional considerations.', *Neuron*, 59(6), pp. 902–913. doi: 10.1016/j.neuron.2008.08.020.

Hoffmann, J. *et al.* (2000) 'A possible role for the Alzheimer amyloid precursor protein in the regulation of epidermal basal cell proliferation', *European Journal of Cell Biology*, 79(12), pp. 905–914. doi: 10.1078/0171-9335-00117.

Hoffmann, N. A. *et al.* (2014) 'Impaired plasticity of cortical dendritic spines in P301S tau transgenic mice', *Acta Neuropathologica Communications*, 2(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/2051-5960-1-82.

Hoffstaetter, L. J. *et al.* (2018) 'Somatosensory Neurons Enter a State of Altered Excitability during Hibernation', *Current Biology*, 28(18), pp. 2998-3004.e3. doi: 10.1016/j.cub.2018.07.020.

Holmes, W. R. (1989) 'The role of dendritic diameters in maximizing the effectiveness of synaptic inputs', *Brain Research*, 478(1), pp. 127–137. doi: 10.1016/0006-8993(89)91484-4.

Horowitz, J. M. and Horwitz, B. A. (2019) 'Extreme neuroplasticity of hippocampal CA1 pyramidal neurons in hibernating mammalian species', *Frontiers in Neuroanatomy*, 13(February), pp. 1–8. doi: 10.3389/fnana.2019.00009.

Hurtley, S. M. (2018) 'Tackling microtubule-tau interactions', *Science*. Edited by S. Hurtley, 360(6394), pp. 1198 LP – 1200. doi: 10.1126/science.360.6394.1198-n.

Infante Velázquez, E. *et al.* (2002) 'Las taupatías', *Rev mex neurocienc*, 1(3), pp. 165–7.

Insausti, R. and Amaral, D. (2004) 'Hippocampal Formation', in *The Human Nervous*

System, pp. 871–914. doi: 10.1016/B978-012547626-3/50024-7.

Iqbal, K., Liu, F. and Gong, C.-X. (2016) 'Tau and neurodegenerative disease: the story so far.', *Nature reviews. Neurology*, 12(1), pp. 15–27. doi: 10.1038/nrneurol.2015.225.

Ito, M., Kato, M. and Kawabata, M. (1998) 'Premature bifurcation of the apical dendritic trunk of vibrissa-responding pyramidal neurones of X-irradiated rat neocortex', *Journal of Physiology*, 512(2), pp. 543–553. doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.543be.x.

Ittner, A. *et al.* (2016) 'Site-specific phosphorylation of tau inhibits amyloid-beta toxicity in Alzheimer's mice.', *Science (New York, N.Y.)*, 354(6314), pp. 904–908. doi: 10.1126/science.aah6205.

Jacobs, B. *et al.* (2001) 'Regional Dendritic and Spine Variation in Human Cerebral Cortex: a Quantitative Golgi Study', *Cerebral Cortex*, 11(6), pp. 558–571. doi: 10.1093/cercor/11.6.558.

Jagust, W. J. *et al.* (1991) 'Diminished glucose transport in alzheimer's disease: Dynamic PET studies', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 11(2), pp. 323–330. doi: 10.1038/jcbfm.1991.65.

Jankowsky, J. L. *et al.* (2005) 'Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(21), pp. 5217–5224. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5080-04.2005.

Jeganathan, S. *et al.* (2006) 'Global Hairpin Folding of Tau in Solution', *Biochemistry*, 45(7), pp. 2283–2293. doi: 10.1021/bi0521543.

Kasai, H. *et al.* (2003) 'Structure-stability-function relationships of dendritic spines', *Trends in Neurosciences*, 26(7), pp. 360–368. doi: 10.1016/S0166-2236(03)00162-0.

Kilduff, T. S. *et al.* (1990) '14C-2-deoxyglucose uptake in the ground squirrel brain during entrance to and arousal from hibernation', *Journal of Neuroscience*, 10(7), pp. 2463–2475. doi: 10.1523/jneurosci.10-07-02463.1990.

Kimura, T. *et al.* (1996) 'Sequential changes of tau-site-specific phosphorylation during development of paired helical filaments.', *Dementia (Basel, Switzerland)*, 7(4), pp. 177–181. doi: 10.1159/000106875.

Kolarova, M. *et al.* (2012) 'Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease', *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2012. doi: 10.1155/2012/731526.

Krelstein, M. S., Thomas, M. P. and Horowitz, J. M. (1990) 'Thermal effects on long-term potentiation in the hamster hippocampus', *Brain Research*, 520(1), pp. 115–122. doi: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91696-E](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91696-E).

Krichmar, J. L. *et al.* (2002) 'Effects of dendritic morphology on CA3 pyramidal cell electrophysiology: A simulation study', *Brain Research*, 941(1–2), pp. 11–28. doi: 10.1016/S0006-8993(02)02488-5.

Krieger, P., De Kock, C. P. J. and Frick, A. (2017) 'Calcium dynamics in basal dendrites of layer 5a and 5b pyramidal neurons is tuned to the cell-type specific physiological action potential discharge', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11(July), pp. 1–10. doi: 10.3389/fncel.2017.00194.

Kumar, A., Singh, A. and Ekavali (2015) 'A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update.', *Pharmacological reports : PR*, 67(2), pp. 195–203. doi:

10.1016/j.pharep.2014.09.004.

Larkman, A. U. (1991) 'Dendritic morphology of pyramidal neurones of the visual cortex of the rat: III. Spine distributions', *Journal of Comparative Neurology*, 306(2), pp. 332–343. doi: 10.1002/cne.903060209.

Lee, K. F. H., Soares, C. and Béique, J.-C. (2012) 'Examining Form and Function of Dendritic Spines', *Neural Plasticity*. Edited by V. Korz, 2012, p. 704103. doi: 10.1155/2012/704103.

León-Espinosa, G. *et al.* (2013) 'Changes in tau phosphorylation in hibernating rodents', *Journal of Neuroscience Research*, 91(7), pp. 954–962. doi: 10.1002/jnr.23220.

León-Espinosa, G. *et al.* (2018) 'Changes in neocortical and hippocampal microglial cells during hibernation', *Brain Structure and Function*, 223(4), pp. 1881–1895. doi: 10.1007/s00429-017-1596-7.

de Leon, M. J. *et al.* (2001) 'Prediction of cognitive decline in normal elderly subjects with 2-¹⁸F-fluoro-2-deoxy-¹⁸F-glucose/positron-emission tomography (FDG/PET)', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(19), pp. 10966 LP – 10971. doi: 10.1073/pnas.191044198.

Lopes, S. *et al.* (2016) 'Tau protein is essential for stress-induced brain pathology', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(26), pp. E3755–E3763. doi: 10.1073/pnas.1600953113.

Lorente de No, R. (1938) 'Cerebral cortex : architecture, intracortical connections, motor projections', *Physiology of the Nervous System*, pp. 288–313. Available at: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10023901762/en/>.

Luna-Muñoz, J. *et al.* (2007) 'Earliest Stages of Tau Conformational Changes are Related to the Appearance of a Sequence of Specific Phospho-Dependent Tau Epitopes in Alzheimer's Disease 1', *Journal of Alzheimer's Disease*, 12, pp. 365–375. doi: 10.3233/JAD-2007-12410.

Magariños, A. M. *et al.* (2006) 'Rapid and reversible changes in intrahippocampal connectivity during the course of hibernation in European hamsters', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(49), pp. 18775–18780. doi: 10.1073/pnas.0608785103.

Majewska, A., Tashiro, A. and Yuste, R. (2000) 'Regulation of spine calcium compartmentalization by rapid spine motility', *Journal of Neuroscience*, 20(22), pp. 8262–8268.

Major, G., Larkum, M. E. and Schiller, J. (2013) 'Active Properties of Neocortical Pyramidal Neuron Dendrites', *Annual Review of Neuroscience*, 36(1), pp. 1–24. doi: 10.1146/annurev-neuro-062111-150343.

Malia, T. J. *et al.* (2016) 'Epitope mapping and structural basis for the recognition of phosphorylated tau by the anti-tau antibody AT8', *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 84(4), pp. 427–434. doi: 10.1002/prot.24988.

Manuscript, A. (2013) 'hibernation', 105(6), pp. 2098–2108. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05294.x.Physiological.

McGeer, P. L. *et al.* (1993) 'Microglia in degenerative neurological disease', *Glia*, 7(1), pp. 84–92. doi: 10.1002/glia.440070114.

- McMillan, P. *et al.* (2008) 'Tau isoform regulation is region- and cell-specific in mouse brain', *Journal of Comparative Neurology*, 511(6), pp. 788–803. doi: 10.1002/cne.21867.
- Medina, M. and Avila, J. (2014) 'The role of extracellular Tau in the spreading of neurofibrillary pathology', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(1 APR), pp. 1–7. doi: 10.3389/fncel.2014.00113.
- Merino-Serrais, P. *et al.* (2013) 'The influence of phospho-tau on dendritic spines of cortical pyramidal neurons in patients with Alzheimer's disease', *Brain*, 136(6), pp. 1913–1928. doi: 10.1093/brain/awt088.
- Mielke, R. and Heiss, W.-D. (1998) 'Positron emission tomography for diagnosis of Alzheimer's disease and vascular dementia BT - Ageing and Dementia', in Jellinger, K., Fazekas, F., and Windisch, M. (eds). Vienna: Springer Vienna, pp. 237–250.
- Mietelska-Porowska, A. *et al.* (2014) 'Tau protein modifications and interactions: Their role in function and dysfunction', *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), pp. 4671–4713. doi: 10.3390/ijms15034671.
- Mitchell, O. G. (1972) 'Human Hibernation and Space Travel', in.
- Morishima-Kawashima, M. and Ihara, Y. (2002) 'Alzheimer's disease: β -Amyloid protein and tau', *Journal of neuroscience research*, 70, pp. 392–401. doi: 10.1002/jnr.10355.
- Mountcastle, V. B. (1997) 'The columnar organization of the neocortex', *Brain*, 120(4), pp. 701–722. doi: 10.1093/brain/120.4.701.
- Mountcastle, V. B. (2003) 'Cerebral Cortex', *Cerebral Cortex*, 13(1), pp. 2–4. doi: 10.1093/cercor/13.1.2.
- Muralidhar, S., Wang, Y. and Markram, H. (2014) 'Synaptic and cellular organization of layer 1 of the developing rat somatosensory cortex', *Frontiers in Neuroanatomy*, 7(JAN), pp. 1–17. doi: 10.3389/fnana.2013.00052.
- Nägerl, U. V. *et al.* (2004) 'Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons', *Neuron*, 44(5), pp. 759–767. doi: 10.1016/j.neuron.2004.11.016.
- Narayanan, R. T. *et al.* (2015) 'Beyond columnar organization: Cell type- and target layer-specific principles of horizontal axon projection patterns in rat vibrissal cortex', *Cerebral Cortex*, 25(11), pp. 4450–4468. doi: 10.1093/cercor/bhv053.
- Narayanan, R. T., Udvary, D. and Oberlaender, M. (2017) 'Cell type-specific structural organization of the six layers in rat barrel cortex', *Frontiers in Neuroanatomy*, 11(October), pp. 1–10. doi: 10.3389/fnana.2017.00091.
- Nicoll, R. A. and Schmitz, D. (2005) 'Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses.', *Nature reviews. Neuroscience*, 6(11), pp. 863–876. doi: 10.1038/nrn1786.
- Oberlaender, M. *et al.* (2012) 'Cell type-specific three-dimensional structure of thalamocortical circuits in a column of rat vibrissal cortex', *Cerebral Cortex*, 22(10), pp. 2375–2391. doi: 10.1093/cercor/bhr317.
- Oddo, S. *et al.* (2003) 'Triple-transgenic model of Alzheimer's Disease with plaques and tangles: Intracellular A β and synaptic dysfunction', *Neuron*, 39(3), pp. 409–421. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00434-3.
- Von Der Ohe, C. G. *et al.* (2006) 'Ubiquitous and temperature-dependent neural plasticity

- in hibernators', *Journal of Neuroscience*, 26(41), pp. 10590–10598. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2874-06.2006.
- Von Der Ohe, C. G. *et al.* (2007) 'Synaptic protein dynamics in hibernation', *Journal of Neuroscience*, 27(1), pp. 84–92. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4385-06.2007.
- Penzes, P. *et al.* (2011) 'Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders : Nature Neuroscience : Nature Publishing Group', *Nat Neurosci*, 14(3), pp. 285–293. doi: 10.1038/nn.2741.Dendritic.
- Perl, D. P. (2010) 'Neuropathology of Alzheimer's disease.', *The Mount Sinai journal of medicine, New York*, 77(1), pp. 32–42. doi: 10.1002/msj.20157.
- Petreanu, L. *et al.* (2009) 'The subcellular organization of neocortical excitatory connections', *Nature*, 457(7233), pp. 1142–1145. doi: 10.1038/nature07709.
- Planel, E. *et al.* (2007) 'Anesthesia leads to tau hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia', *Journal of Neuroscience*, 27(12), pp. 3090–3097. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4854-06.2007.
- Popov, V. I. *et al.* (1992) 'Repeated Changes of Dendritic Morphology in the Hippocampus of G R O U N D Squirrels in the', *Neuroscience*, 48(1), pp. 45–51.
- Popov, V. I. *et al.* (2007) 'Reversible reduction in dendritic spines in CA1 of rat and ground squirrel subjected to hypothermia-normothermia in vivo: A three-dimensional electron microscope study', *Neuroscience*, 149(3), pp. 549–560. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.07.059.
- Popov, V. I. and Bocharova, L. S. (1992) 'Hibernation-induced structural changes in synaptic contacts between mossy fibres and hippocampal pyramidal neurons', *Neuroscience*, 48(1), pp. 53–62. doi: 10.1016/0306-4522(92)90337-2.
- Ramaswamy, S. and Markram, H. (2015) 'Anatomy and physiology of the thick-tufted layer 5 pyramidal neuron', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(JUNE), pp. 1–29. doi: 10.3389/fncel.2015.00233.
- Regalado-Reyes, M. *et al.* (2019) 'Phospho-tau changes in the human CA1 during Alzheimer's disease progression', *Journal of Alzheimer's Disease*, 69(1), pp. 277–288. doi: 10.3233/JAD-181263.
- Regalado-Reyes, M. *et al.* (2020) 'Effect of Phosphorylated Tau on Cortical Pyramidal Neuron Morphology during Hibernation', *Cerebral Cortex Communications*, 1(1). doi: 10.1093/texcom/tgaa018.
- Ren, C. *et al.* (2018) 'Hypoxia, hibernation and Neuroprotection: An experimental study in mice', *Aging and Disease*, 9(4), pp. 761–768. doi: 10.14336/AD.2018.0702.
- Rajo, C. *et al.* (2016) 'Laminar Differences in Dendritic Structure of Pyramidal Neurons in the Juvenile Rat Somatosensory Cortex', *Cerebral Cortex*, 26(6), pp. 2811–2822. doi: 10.1093/cercor/bhv316.
- Rosenberg, S. S. and Spitzer, N. C. (2011) 'Calcium signaling in neuronal development', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(10), pp. a004259–a004259. doi: 10.1101/cshperspect.a004259.
- Ruf, T. and Geiser, F. (2016) 'Europe PMC Funders Group Daily torpor and hibernation in birds and mammals', 90(3), pp. 891–926. doi: 10.1111/brv.12137.Daily.

- Ryan, L. (2016) 'Alzheimer ' S Disease Prevention Trials', 000544(5), pp. 1–34. doi: 10.1002/ana.21154.TDP-43.
- Sanchez-Mejias, E. *et al.* (2016) 'Soluble phospho-tau from Alzheimer's disease hippocampus drives microglial degeneration.', *Acta neuropathologica*, 132(6), pp. 897–916. doi: 10.1007/s00401-016-1630-5.
- Schneider, A. *et al.* (1999) 'Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments.', *Biochemistry*, 38(12), pp. 3549–3558. doi: 10.1021/bi981874p.
- Serrano-Pozo, A. *et al.* (2011) 'Neuropathological alterations in Alzheimer disease', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), pp. 1–24. doi: 10.1101/cshperspect.a006189.
- Simmons, D. A. *et al.* (2007) 'Ferritin accumulation in dystrophic microglia is an early event in the development of Huntington's disease.', *Glia*, 55(10), pp. 1074–1084. doi: 10.1002/glia.20526.
- Slomianka, L. *et al.* (2011) 'Hippocampal pyramidal cells: The reemergence of cortical lamination', *Brain Structure and Function*, 216(4), pp. 301–317. doi: 10.1007/s00429-011-0322-0.
- Sonntag, M. and Arendt, T. (2019) 'Neuronal Activity in the Hibernating Brain.', *Frontiers in neuroanatomy*, 13, p. 71. doi: 10.3389/fnana.2019.00071.
- Squire, L. and Dedie, A. (2015) 'Conscious and Unconscious Memory Systems', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7. doi: 10.1101/cshperspect.a021667.
- Squire, L. R. *et al.* (2015) 'Memory consolidation', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(8), pp. a021766–a021766. doi: 10.1101/cshperspect.a021766.
- Stephan, H. and Andy, O. (2006) 'Quantitative comparative neuroanatomy of primates: An attempt at a phylogenetic interpretation', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 167, pp. 370–387. doi: 10.1111/j.1749-6632.1969.tb20457.x.
- Stieler, J. T. *et al.* (2011) 'The physiological link between metabolic rate depression and tau phosphorylation in mammalian hibernation', *PLoS ONE*, 6(1). doi: 10.1371/journal.pone.0014530.
- Strang, K. H. *et al.* (2019) 'Phosphorylation of serine 305 in tau inhibits aggregation.', *Neuroscience letters*, 692, pp. 187–192. doi: 10.1016/j.neulet.2018.11.011.
- Streit, W. J. *et al.* (2014) 'Microglial pathology', *Acta Neuropathologica Communications*, 2(1), p. 142. doi: 10.1186/s40478-014-0142-6.
- Streit, W. J., Mrak, R. E. and Griffin, W. S. T. (2004) 'Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective.', *Journal of neuroinflammation*, 1(1), p. 14. doi: 10.1186/1742-2094-1-14.
- Streit, W. J. and Xue, Q.-S. (2009) 'Life and death of microglia.', *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 4(4), pp. 371–379. doi: 10.1007/s11481-009-9163-5.
- Strumwasser, F. (1958) 'Regulatory mechanisms, brain activity and behavior during deep hibernation in the squirrel, *Citellus beecheyi*', *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 196(1), pp. 23–30. doi: 10.1152/ajplegacy.1958.196.1.23.

- Szymusiak, R., Alam, N. and McGinty, D. (2000) 'Discharge patterns of neurons in cholinergic regions of the basal forebrain during waking and sleep', *Behavioural Brain Research*, 115(2), pp. 171–182. doi: [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(00\)00257-6](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(00)00257-6).
- Tashiro, K. *et al.* (1997) 'Somatodendritic localization of phosphorylated tau in neonatal and adult rat cerebral cortex', *NeuroReport*, 8(12). Available at: https://journals.lww.com/neuroreport/Fulltext/1997/08180/Somatodendritic_localization_of_phosphorylated_tau.29.aspx.
- Tessier, S. and Wu, C.-W. (2019) 'Molecular control of protein synthesis, glucose metabolism, and apoptosis in the brain of hibernating thirteen-lined ground squirrels', *Biochemistry and Cell Biology*, 97. doi: 10.1139/bcb-2018-0256.
- Thomson, A. M. (2007) 'Functional maps of neocortical local circuitry', *Frontiers in Neuroscience*, 1(1), pp. 19–42. doi: 10.3389/neuro.01.1.1.002.2007.
- Thomson, A. M. (2010) 'Neocortical layer 6, a review', *Frontiers in Neuroanatomy*, 4(MARCH), pp. 1–14. doi: 10.3389/fnana.2010.00013.
- Vetter, P., Roth, A. and Häusser, M. (2001) 'Propagation of action potentials in dendrites depends on dendritic morphology', *Journal of Neurophysiology*, 85(2), pp. 926–937. doi: 10.1152/jn.2001.85.2.926.
- Violet, M. *et al.* (2014) 'A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(MAR), pp. 1–11. doi: 10.3389/fncel.2014.00084.
- Voglis, G. and Tavernarakis, N. (2006) 'The role of synaptic ion channels in synaptic plasticity.', *EMBO reports*, 7(11), pp. 1104–1110. doi: 10.1038/sj.embor.7400830.
- Wake, H. and Fields, R. D. (2011) 'Physiological function of microglia.', *Neuron glia biology*, 7(1), pp. 1–3. doi: 10.1017/S1740925X12000166.
- Wang, X. Bin, Yang, Y. and Zhou, Q. (2007) 'Independent expression of synaptic and morphological plasticity associated with long-term depression', *Journal of Neuroscience*, 27(45), pp. 12419–12429. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2015-07.2007.
- Wang, Y. and Mandelkow, E. (2016) 'Tau in physiology and pathology', *Nature Reviews Neuroscience*, 17(1), pp. 5–21. doi: 10.1038/nrn.2015.1.
- Weingarten, M. D. *et al.* (1975) 'A protein factor essential for microtubule assembly', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(5), pp. 1858–1862. doi: 10.1073/pnas.72.5.1858.
- White, E. L. (1989) *Cortical circuits*.
- Wimmer, V. C. *et al.* (2010) 'Dimensions of a Projection Column and Architecture of VPM and POm Axons in Rat Vibrissal Cortex', *Cerebral Cortex*, 20(10), pp. 2265–2276. doi: 10.1093/cercor/bhq068.
- Xie, Y., Chen, S. and Murphy, T. (2012) 'Dendritic spines and pre-synaptic boutons are stable despite local deep hypothermic challenge and re-warming in vivo', *PLoS ONE*, 7(5), pp. 2–7. doi: 10.1371/journal.pone.0036305.
- Yanagisawa, M. *et al.* (1999) 'Starvation induces tau hyperphosphorylation in mouse brain: implications for Alzheimer's disease', *FEBS Letters*, 461(3), pp. 329–333. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01480-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01480-5).

Yoshida, H. and Goedert, M. (2006) 'Sequential phosphorylation of tau protein by cAMP-dependent protein kinase and SAPK4/p38 δ or JNK2 in the presence of heparin generates the AT100 epitope', *Journal of Neurochemistry*, 99(1), pp. 154–164. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04052.x.

Yoshiyama, Y. *et al.* (2007) 'Synapse Loss and Microglial Activation Precede Tangles in a P301S Tauopathy Mouse Model', *Neuron*, 53(3), pp. 337–351. doi: 10.1016/j.neuron.2007.01.010.

Yuste, R. (2010) *Dendritic Spines*.

Yuste, R. and Bonhoeffer, T. (2001) 'Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity.', *Annual review of neuroscience*, 24, pp. 1071–1089. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.1071.

Yuste, R. and Majewska, A. (2001) 'On the function of dendritic spines.', *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 7(5), pp. 387–395. doi: 10.1177/107385840100700508.

Zhang, H. and Cuevas, J. (2002) 'Sigma receptors inhibit high-voltage-activated calcium channels in rat sympathetic and parasympathetic neurons', *Journal of Neurophysiology*, 87(6), pp. 2867–2879. doi: 10.1152/jn.2002.87.6.2867.

Zhang, Y. *et al.* (2013) 'Rapid single-step induction of functional neurons from human pluripotent stem cells', *Neuron*, 78(5), pp. 785–798. doi: 10.1016/j.neuron.2013.05.029.

Zhou, F. *et al.* (2001) 'Hibernation, a model of neuroprotection', *American Journal of Pathology*, 158(6), pp. 2145–2151. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64686-X.

Zhou, Q., Homma, K. J. and Poo, M. M. (2004) 'Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses', *Neuron*, 44(5), pp. 749–757. doi: 10.1016/j.neuron.2004.11.011.

Zuo, Y. *et al.* (2005) 'Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex.', *Neuron*, 46(2), pp. 181–189. doi: 10.1016/j.neuron.2005.04.001.

9. ANEXO

Los textos científicos publicados durante la presente tesis doctoral son los siguientes:

Regalado-Reyes, M. *et al.* (2020) 'Effect of Phosphorylated Tau on Cortical Pyramidal Neuron Morphology during Hibernation', *Cerebral Cortex Communications*, 1(1). doi: 10.1093/texcom/tgaa018.

Regalado-Reyes, M. *et al.* (2019) 'Phospho-tau changes in the human CA1 during Alzheimer's disease progression', *Journal of Alzheimer's Disease*, 69(1), pp. 277–288. doi: 10.3233/JAD-181263.

Benavides-Piccione, R. *et al.* (2019) 'Differential Structure of Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons in the Human and Mouse', *Cerebral Cortex*, (July), pp. 1–23. doi: 10.1093/cercor/bhz122.

Gonzalez-Riano, C. *et al.* (2019) 'Metabolomic Study of Hibernating Syrian Hamster Brains: In Search of Neuroprotective Agents', *Journal of Proteome Research*, 18(3), pp. 1175–1190. doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00816.

León-Espinosa, G. *et al.* (2018) 'Changes in neocortical and hippocampal microglial cells during hibernation', *Brain Structure and Function*, 223(4), pp. 1881–1895. doi: 10.1007/s00429-017-1596-7.